

DANIELA APARECIDA TEIXEIRA

CULTIVO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE *Vernonia polyanthes* (Spreng.) Less

Botucatu-SP

2020

DANIELA APARECIDA TEIXEIRA

CULTIVO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE *Vernonia polyanthes* (Spreng.) Less

Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Horticultura, apresentada à Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP - Campus de Botucatu, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Horticultura)

Orientador: Prof. Dr. Filipe Pereira Giardini Bonfim

Botucatu-SP

2020

T266c Teixeira, Daniela Aparecida
Cultivo e composição química de *Vernonia polyanthes*
(Spreng.) Less / Daniela Aparecida Teixeira. -- Botucatu,
2020
64 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu
Orientador: Filipe Pereira Giardini Bonfim

1. Plantas medicinais. 2. Compostos bioativos. 3.
Fitoterapia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: **“CULTIVO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE *Vernonia polyanthes* (Spreng.) Less”**

AUTORA: DANIELA APARECIDA TEIXEIRA

ORIENTADOR: FILIPE PEREIRA GIARDINI BONFIM

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (HORTICULTURA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FILIPE PEREIRA GIARDINI BONFIM
Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu - UNESP

Dr.^a MÁRCIA ORTIZ MAYO MARQUES
Centro de P&D de Recursos Genéticos Vegetais / Instituto Agronômico de Campinas

Prof.^a Dr.^a ELIZABETH ORIKA ONO
Botânica / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

Prof. Dr. MARCIO GONÇALVES CAMPOS
Agronomia / Faculdade Galileu

Prof. Dr. LEANDRO JOSE GRAVA DE GODOY
Coordenadoria do Curso de Engenharia Agrônômica / UNESP - Câmpus de Registro

Botucatu, 03 de abril de 2020.

Ao povo brasileiro, que luta incansavelmente, dia após dia,
de sol em sol com honra e dignidade mostrando a sua força,
garra e esperança no futuro.

“Só há duas opções nesta vida: se resignar ou se indignar.
E eu não vou me resignar nunca.”

Darcy Ribeiro

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus familiares em especial a minha mãe Therezinha, meu irmão Roberto e meu sobrinho Rafael por todo apoio nessa etapa decisiva da minha vida acadêmica.

Agradeço a FCA/UNESP Botucatu ao Programa de pós Graduação em Agromonia – Horticultura, aos docentes e funcionários por toda ajuda e aprendizado essenciais para minha formação profissional e pessoal.

Ao meu orientador Prof. Dr. Filipe Pereira Giardini Bonfim pela confiança e amizade. Por ter me orientado desde graduação até o doutorado.

Ao Dr. Lucas Ferenzini Alves pela doação das mudas de assa-peixe que foram imprescindíveis para execução desse projeto, deixo meu mais sincero obrigado!

Aos amigos que me auxiliaram na realização e concretização dessa etapa, às vezes exaustiva, sempre estando dispostos a me ajudarem nas mais variadas tarefas da vida: acadêmica/profissional ou pessoal. Nada disso poderia ter sido concretizado sem a presença (ajuda) de vocês. Em especial gostaria de destacar dois nomes essenciais: Jordany Oliveira e Nathalia Parreiras.

A professora Marcia Ortiz Mayo Marques pela disposição e colaboração nas análises dos óleos essenciais. Ao amigo Júlio César Rodrigues, que prontamente me ajudou nessa etapa. A querida Priscila Dandaro, que mesmo distante geograficamente sempre me apoiou com suas palavras de incentivo. Ao amigo Ricardo Felito, o qual este doutorado me proporcionou a oportunidade de conhecer, conviver e que se mostrou um amigo muito presente e fundamental nesta etapa difícil. Ao ex-funcionário e grande amigo Sr. Lima, que me acompanhou desde o final da minha graduação e ao longo de toda a trajetória na pós Graduação. Uma das pessoas mais trabalhadoras que tive a oportunidade de conviver e aprender e que se tornou um grande amigo nesse percurso.

Aos meus bichos de estimação que são meu alicerce diário: Tarsila, Capitu, Bilu e Kratos (*in memoriam*) obrigada por serem “muito” num mundo onde tantos são “tão pouco”.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro na execução da pesquisa e estudos científicos desenvolvidos.

“O *Corpus Hippocraticum* compreendia vários tratados (...) nele, o remédio perdia seu significado mágico, passando a ser usado como substância exterior ao corpo capaz de produzir uma reação favorável, capaz de modificar o estado presente.”

ALBARRACIN, A. O fármaco no mundo antigo – o fármaco em Roma a obra de Galeano. *História do medicamento*. V.2. Rio de Janeiro: Glaxo do Brasil; 1993.

RESUMO

A espécie *Vernonia polyanthes* (Spreng.) Less., Asteraceae, popularmente conhecida como assa-peixe, assa-peixe-branco, mata-pasto, é nativa do Brasil com ampla distribuição (regiões sul e sudeste e centro-oeste) comum em área de Cerrado em São Paulo, Mato Grosso, Minas Gerais e Goiás, e na orla Atlântica. Há poucas informações na literatura, sobre técnicas de cultivo para essa espécie. Com isso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar adubação orgânica, níveis de calagem, época de colheita e densidade de plantio na produtividade e produção de compostos bioativos de assa-peixe. Os experimentos foram realizados na Fazenda Experimental Lageado, da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Câmpus de Botucatu - SP. O trabalho foi dividido em dois capítulos, onde no capítulo 1 foi abordada a adubação com esterco de curral curtido e níveis de calagem na produtividade e a influência na produção de óleo essencial. As variáveis analisadas foram massa seca de raízes, massa seca das folhas, altura das plantas comprimento da maior raiz, volume da raiz, diâmetro do caule e número de folhas. Houve efeito significativo da adubação no volume da raiz e na massa seca da raiz. Plantas que não receberam adubo apresentaram maior valor para essas características. O maior teor de óleo essencial foi para a dose de 9 kg m⁻² de adubo. Na avaliação dos compostos químicos, foram identificadas 13 substâncias no óleo essencial e o germacreno D foi o composto majoritário, que se destacou tanto para adubação quanto para calagem. Os taninos solúveis e cumarina não apresentaram diferenças significativas tanto para calagem quanto para adubação. A atividade antioxidante para adubação foi alcançada com a dose de 12 kg m⁻² e para calagem com os V% de 75 e 90. Nos diferentes níveis de calagem no solo, houve efeito significativo para número de folhas, massa seca de folhas e volume de raízes, sendo os valores de V% de 75 e 90 os que obtiveram melhores respostas. O maior teor de óleo foi para o V% de 29. No capítulo 2 foram abordadas quatro épocas de colheita e sua influência na produção de metabólitos secundários. Aos 180, 240, 300 e 360 dias após o plantio. As características avaliadas foram altura de plantas, diâmetro e massa seca de folhas. De acordo com as avaliações citadas, a melhor época para colheita foi em torno dos 300 dias após o plantio, melhor época para colheita de folhas de onde foram extraídos o óleo essencial, taninos e cumarina, além da determinação da atividade antioxidante. Não houve diferença significativa para o teor de óleo essencial e para cumarina, taninos e atividade antioxidante. A composição foi à mesma da adubação e calagem com composto majoritário germacreno D. Para o experimento de espaçamento, foram avaliados quatro espaçamentos: 1mx0, 5m; 1mx1m; 1mx1, 5m e 1mx2m e o teor de óleo essencial, taninos e cumarinas além da atividade antioxidante. As características biométricas avaliadas (altura de plantas, diâmetro do caule e massa seca) não apresentaram diferenças estatísticas. O espaçamento que apresentou melhor resultado foi 1mx2m tanto para as características biométricas, quanto para taninos. O perfil do óleo não se alterou e não houve diferenças estatísticas para teor de cumarina e atividade antioxidante.

Palavras-chave: Contribuições agronômicas. Plantas medicinais. Compostos bioativos. Fitoterapia.

ABSTRACT

The species *Vernonia polyanthes* (Spreng.) Less., Asteraceae, popularly known as assa-peixe, assa-peixe-branco, cambará-branco, mata-pasto, are native to Brazil with wide distribution (south and southeast regions and central-west) common in Cerrado area in São Paulo, Mato Grosso, Minas Gerais and Goiás, and in the Atlantic coast. There is little information in the literature about cultivation techniques for this species. Thus, the present work aimed to evaluate organic fertilization, liming levels, harvest time and planting density in the productivity and production of bioactive compounds of assa-peixe. The experiments were carried out at Fazenda Experimental Lageado, Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Campus Botucatu - SP. The work was divided into two chapters, where Chapter 1 was approached fertilization with cattle manure tanned and liming levels in productivity and influence in essential oil production. The variables analyzed were dry root weight, dry leaf weight, plant height, length of the largest root, root volume, stem diameter and number of leaves. There was a significant effect of fertilization on root volume and root dry matter. Plants that did not receive fertilizer showed higher value for these characteristics. The highest content of essential oil was for the dose of 9 kg m⁻² of fertilizer. In the evaluation of chemical compounds, 13 substances were identified in the essential oil and germacrene D was the major compound, which stood out both for fertilization and for liming. Soluble tannins and coumarin did not show significant differences for both liming and fertilization. The antioxidant activity for fertilization was achieved with the dose of 12 kg m⁻² and for liming with the V% of 75 and 90. In the different levels of liming in the soil, there was a significant effect on number of leaves, dry leaf mass and volume roots, with the V% values of 75 and 90 being the ones that obtained the best responses. The highest oil content was for the V% of 29. In chapter 2, four harvest seasons and their influence on the production of secondary metabolites were addressed. At 180, 240, 300 and 360 days after planting. The characteristics evaluated were plant height, diameter and dry leaf mass. According to the aforementioned evaluations, the best time to harvest was around 300 days after planting, the best time to harvest leaves from which essential oil, tannins and coumarin were extracted, in addition to determining antioxidant activity. There was no significant difference for essential oil content and for coumarin, tannins and antioxidant activity. The composition was the same as for fertilizing and liming with a major germacrene compound D. For the spacing experiment, four spacing were evaluated: 1mx0.5m; 1mx1m; 1mx1.5m and 1mx2m and the content of essential oil, tannins and coumarins in addition to antioxidant activity. The biometric characteristics evaluated (plant height, stem diameter and dry mass) did not show statistical differences. The spacing that showed the best result was 1mx2m for both biometric characteristics and tannins. The oil profile did not change and there were no statistical differences for coumarin content and antioxidant activity.

Keywords: Agronomic contributions. Medicinal plants. Bioactive compounds. Phytotherapy.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	17
CAPÍTULO 1 - NÍVEIS DE COMPOSTO ÔRGANICO E CALAGEM NA PRODUÇÃO E NO CONTEÚDO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM <i>Vernonia polyanthes</i> (Spreng.) Less.....	21
1.1 INTRODUÇÃO.....	22
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS.....	37
CAPÍTULO 2- PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ASSA-PEIXE EM FUNÇÃO DA ÉPOCA DE COLHEITA E DENSIDADE DE PLANTIO.....	41
2.1 INTRODUÇÃO.....	42
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS.....	58
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
REFERÊNCIAS.....	63

INTRODUÇÃO GERAL

Planta medicinal pode ser definida como toda espécie vegetal, administrada ao homem que desempenha qualquer função terapêutica (LOPES et al., 2005). O primeiro relato do uso de plantas com finalidade curativa data do Paleolítico (5000-1000 a.C.) (DIAS, 2004). Nas sociedades urbanas da Mesopotâmia e Egito encontra-se a base do conhecimento sobre as plantas medicinais que, depois de longos períodos, alcançaram nossos antepassados (CUNHA, 2012). O documento médico-farmacêutico mais antigo foi encontrado nas civilizações sumérias (3000-1900 a.C.), uma tábua de argila em escrita cuneiforme com quinze receitas contendo plantas medicinais como açafão (*Crocus sativus* L.), canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume), salgueiro (*Salix alba* L.), cânhamo (*Cannabis sativa* L), etc. (CARVALHO, 2004; CUNHA, 2007; DIAS, 2004; LOPES, 2004).

Já nas Américas, no Brasil propriamente dito, há evidências de atividade humana em sítios localizados no Piauí e em Santa Catarina. Tais evidências vão de encontro à ocorrência de uma antiga civilização – Tradição Nordeste – datada de 12000 a 7000 a. P. No Piauí, há vestígios de formas embrionárias de parasitos intestinais e grão-de-pólen de plantas com ou sem propriedades anti-helmínticas. As espécies seriam *Sida spp* e outra não identificada em nível de espécie, da família Chenopodiaceae. Apesar de *Sida spp* não apresentar tal atividade, seu uso é descrito para abrandamento dos sintomas causados por tais parasitas intestinais (TEIXEIRA-SANTOS, 2010).

Em 2006 o Governo Federal aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápico (PNPMF), mediante o Decreto 5.813, e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPI C), através da Portaria MS 971, onde estão incluídas plantas medicinais e fitoterápicos. Nas diretrizes da política Nacional, Portaria Interministerial 2.960/2008, está previsto o estímulo à produção de fitoterápicos e o reconhecimento da medicina tradicional (BRASIL, 2011).

Em 2009 foi divulgado pelo PNPMF a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), dispendo de 71 espécies vegetais. A lista tem como objetivo trazer orientação sobre pesquisas para contribuir com a elaboração/desenvolvimento de fitoterápicos seguros e eficazes (BRASIL, 2011).

Dentre a relação de espécies, tem-se *Vernonia polyanthes* (Spreng.) Less, Asteraceae, popularmente conhecida como assa-peixe, assa-peixe-branco,

cambará-branco, cambará-açú, alecrim-do-campo, assa-peixe-roxo, chamarrita, assa-peixe-do-Pará, erva-preá, cambará-guaçu, cambarazinho, casca-preta, tramanhém, erva-de-mula, mata-pasto, salsa-da-praia (ALVES e NEVES, 2003; BIREME, 2014; KISSMANN, 1999; LORENZI; MATOS, 2008). É uma espécie nativa do Brasil com ampla distribuição (regiões sul e sudeste e centro-oeste) comum em área de cerrado em São Paulo, Mato Grosso, Minas Gerais e Goiás, e na orla Atlântica (ALVES; NEVES, 2003; HATTORI; NAKAJIMA, 2008; KISSMANN, 1999; LORENZI; MATOS, 2008). Não se trata de uma espécie endêmica, tendo relatos de ocorrência no México, Belize, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Panamá, Venezuela, Bolívia, Colômbia, Equador Paraguai e Peru (HATTORI; NAKAJIMA, 2011; SANTANA et al., 2013).

As folhas de assa-peixe são utilizadas na forma de decocto para torções, contusões, luxações, hemorroidas; como infusão para problemas renais, infecções do útero, tosses e resfriados. Há relatos de usos como diurética, anti-hipertensiva, anti-hemorragica, sedativa, abortiva, anti-helmíntica, antiulcerogênica e cicatrizante (ALVES; NEVES, 2003; BARBASTEFANO et al., 2007; MARTUCCI, 2012; PROBST, 2012; SILVA et al., 2012). Dentre todos os usos citados, o mais comum tem sido no tratamento de afecções do aparelho respiratório como chá (RODRIGUES; CARVALHO, 2001; SILVA et al., 2012). Nas informações que constam na farmacopeia sobre essa espécie, essa é atividade que esta regulamentada (afecções do trato respiratório), porém não há dados farmacológicos que comprovem essa ação (BRASIL, 2011). Essas ações estão relacionadas a gama de compostos especializados que a espécie possui, em sua grande parte do grupo dos terpenos (óleos essenciais) e dos polifenóis. Terpenos são classes de compostos secundários dos vegetais são originados pela através da via do ácido mevalônico ou do metileritrol-fosfato. Já polifenóis obedecem à via de síntese do ácido chiquímico e mevalônico (ALVES, 2001; PERES, 2004).

Além do potencial medicinal, é uma planta importante na meliponicultura pela alta quantidade de flores que, atraem grande número de abelhas interessadas tanto pelo néctar como pelo pólen (WIESE, 1983; BAYLÃO JUNIOR et al., 2007). O mel de assa-peixe é composto por ácidos fenólicos e flavonoides, o que o caracteriza como produto com alto potencial antioxidante (PEREIRA, 2010). Suas folhas fritas possuem reconhecido potencial alimentício utilizado na culinária brasileira (MORAIS et al., 2015).

Apesar de apresentar grande importância, poucos estudos são encontrados na literatura com enfoque no cultivo da espécie. A fenologia é uma ferramenta que pode auxiliar no cultivo. Os eventos fenológicos da população de assa-peixe estudados por Gomes et al. (2020) observou sincronia, onde os picos de atividade e intensidade das fenofases ocorrem no mesmo período. O acompanhamento do crescimento da espécie é periódico e sazonal e a temperatura tem forte influência nas fenofases. O teor de compostos secundários, óleos essenciais e polifenóis totais, são maiores nas fases de folhas maduras e senescentes. Outra questão levantada por Alves (2018) era referente a propagação vegetativa que apontou resultados favoráveis a produção de mudas de assa-peixe por miniestaquia, com taxa de enraizamento de 75%.

É uma espécie que apresenta hábito de crescimento como arbustiva ou arbórea, com média de 2,5 m de altura, amplamente ramificada, ramos são sulcados, glabrescentes, angulosos e densamente pilosos (ALVES; NEVES, 2003; HATTORI; NAKAJIMA, 2011; KISSMANN, 1999). As folhas são simples alternadas, lanceoladas, pecioladas, pecíolos apresentam comprimento variado, com base atenuada e ápice agudo ou acuminado. As margens inteiras ou levemente serradas na parte apical, com comprimento de até 18 cm e 6 cm de largura, nervuras duplamente proeminentes (sendo mais na face dorsal). Apresenta face adaxial áspera, esparso-estrigosa, glandulosa e face abaxial pilosa, estrigosa, glandulosa. De cor verde, sendo esta mais clara na face abaxial (KISSMANN, 1999; ALVES; NEVES, 2003; HATTORI; NAKAJIMA, 2011; JORGE et al., 1991). A inflorescência é composta por flores brancas, disposta no ápice dos ramos, com capítulos pequenos, sésseis ou curtamente pedunculados, formados por 10 a 15 flores reunidas em panículas escorpioides. O grande volume das inflorescências, com flores geralmente brancas e aromáticas é característico da espécie (KISSMANN, 1999; ALVES; NEVES, 2003). Apresenta também caule lenhoso e muito ramificado. A raiz é principalmente pivotante, com extenso sistema radicular (KISSMANN, 1999).

Quanto à descrição microscópica a lâmina foliar é dorsoventral, hipostomática, com tricomas em ambas as faces, sendo estes pluri, homo e heterocelulares. A face adaxial possui epiderme uniestratificada cujas células apresentam paredes retas ou levemente curvas, contendo estômatos, tricomas simples, pluricelulares (KISSMANN, 1999; ALVES; NEVES, 2003). Os estômatos são anomocíticos situados nas proximidades das nervuras. Há grande quantidade

de drusas em toda a região parenquimática. Os tricomas caracterizam-se por apresentarem células com diferentes graus de espessamento, sendo a apical longa, com paredes finas e de extremo afilado. O parênquima paliçádico é unisseriado, constituído por células altas e estreitas. O lacunoso contém células de secção lobada. O mesófilo dorsiventral possui uma ou duas camadas de parênquima paliçádico, e se observam tubos de látex, retos e de grande calibre. Também são encontrados grãos de amido e gotículas de óleo essencial (ALVES; NEVES, 2003; JORGE et al., 1991).

A face abaxial possui epiderme uniestratificada contendo células fundamentais de dimensões bastante variáveis, com paredes delgadas, onduladas, e tricomas simples pluricelulares, do tipo bigorna e capitados. Apresenta ainda, tricoma glandular de cabeça arredondada, grande, unicelular, inserido diretamente em depressões da epiderme (sem pedúnculo). A epiderme abaxial exibe células com paredes de contorno sinuoso. A nervura principal exibe contorno biconvexo, com colênquima do tipo angular e com parênquima contendo cristais prismáticos e (HATTORI; NAKAJIMA, 2011; MENDONÇA et al., 2009).

Tendo em vista todo o exposto anteriormente, o trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da adubação orgânica, níveis de calagem, época de colheita e densidade de plantio na produtividade e no teor e composição de óleo essencial bem como conteúdo de taninos solúveis, atividade antioxidante e cumarina em *Vernonia polyanthes* (Spreng.) Less.

CAPÍTULO 1
DOSES SE ADUBAÇÃO ORGÂNICA E CALAGEM NA PRODUÇÃO E NO
CONTEÚDO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM *Vernonia polyanthes* (Spreng.)
Less.

RESUMO

O assa-peixe é uma espécie nativa do Brasil, produtora de compostos bioativos como polifenóis e óleos essenciais, que estão relacionadas com as mais diversas ações terapêuticas as quais são atribuídas à espécie como, expectorante, anti-hipertensiva, anti-inflamatório, etc. Apesar de ter um amplo uso, não se conhece muito sobre o cultivo e a sua relação com a produção de metabólitos especializados. Tendo em vista sua importância no uso terapêutico e é uma das 71 espécies da lista do SUS, o trabalho teve como objetivo avaliar duas etapas de cultivo de assa-peixe. Diferentes níveis de calagem e doses de composto orgânico esterco de curral no desenvolvimento e produção de compostos bioativos. O experimento foi conduzido sob condições de casa de vegetação de junho de 2018 a maio de 2019. Os tratamentos da adubação foram: 3 kg m⁻² 6 kg m⁻² 9 kg m⁻² 12 kg m⁻² e 0 kg m⁻² (testemunha). Para calagem, os tratamentos consistiram em variações dos níveis de calcário Os tratamentos consistiram em: V% de 29 (solo sem adição de calcário), V% de 45, V% de 60, V% de 75 e V% de 90. Foram avaliadas as seguintes características: massa seca de raízes e folhas, altura das plantas, comprimento da maior raiz, volume da raiz, diâmetro do caule e número de folhas. De acordo com as avaliações do estudo, houve efeito significativo da adubação no volume e na massa seca da raiz. Plantas que não receberam adubo, responderam com maior valor para essas características. O maior teor de óleo foi para dose de 9 kg m⁻² e o composto majoritário identificado foi o germacreno D que se destacou tanto para adubação quanto para calagem. Os taninos solúveis e cumarina não apresentaram diferenças significativas tanto para calagem quanto para adubação. A atividade antioxidante para adubação foi alcançada com a dose de 12 kg m⁻² e para calagem com os V% de 75 e 90. Nos diferentes níveis de calagem no solo, houve efeito significativo para número de folhas, massa seca de folhas e volume de raízes, sendo os valores de V% de 75 e 90 os que obtiveram melhores respostas. O maior teor de óleo foi para o V% de 29. Para calagem, houve efeito significativo para número de folhas, massa seca de folhas e volume de raízes. Os valores de V% de 75 e 90 foram os que obtiveram melhores respostas. O maior teor de óleo foi para o V% de 29 e com o mesmo composto majoritário da adubação.

Palavras-chaves: Saturação de bases. Composto orgânico. Assa-peixe.

CHAPTER 1

DOSES IF ORGANIC FERTILIZATION AND LIMING IN THE PRODUCTION AND CONTENT OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN *Vernonia polyanthes* (Spreng.) Less.

ABSTRACT

Assa-peixe is a native species from Brazil, producing bioactive compounds such as polyphenols and essential oils, which are related to the most diverse therapeutic actions which are attributed to the species as expectorant, antihypertensive, anti-inflammatory, etc. Although widely used, little is known about cultivation and its relationship to the production of specialized metabolites. Considering that it is one of the 71 species on the SUS list, the objective of this study was to evaluate two stages of assa-peixe cultivation. The two stages were liming levels and doses of corral manure organic compound in the development and production of bioactive compounds. The experiment was conducted under greenhouse conditions from June 2018 to May 2019. The fertilization treatments were: T1: 3 kg m⁻² T2: 6 kg m⁻² T3: 9 kg m⁻² T4: 12 kg m⁻² and T5: 0 kg m⁻² (control). For liming, the treatments consisted of lime levels. The treatments consisted of T1: V% of 29 (soil without lime), T2: V% of 45, T3: V% of 60, T4: V% of 75 and T5. : V% of 90. The following characteristics were evaluated: root dry mass, leaves, plant height, largest root length, root volume stem diameter and number of leaves. According to the study's evaluations, there was a significant effect of fertilization on root volume and dry mass. Plants that did not receive fertilizer, responded with greater value for these characteristics. The highest oil content was for a 9 kg m⁻² dose and the major compound identified was germacrene D, which stood out for both fertilization and lime. Soluble tannins and coumarin did not show significant differences for both liming and fertilization. The antioxidant activity for fertilization was achieved with the dose of 12 kg m⁻² and for liming with the V% of 75 and 90. In the different levels of liming in the soil, there was a significant effect on the number of leaves, dry leaf mass and volume roots, with the V% values of 75 and 90 being the ones that obtained the best responses. The highest oil content was for the V% of 29. For liming, there was a significant effect on the number of leaves, dry leaf mass and root volume. The V% values of 75 and 90 were those that obtained the best responses. The highest oil content was for the V% of 29 and with the same major compound of fertilization.

Keywords: Saturation base. Organic compost. Assa-peixe.

1.1 INTRODUÇÃO

Espécie nativa do Brasil, o assa-peixe é amplamente empregado em tratamentos de gripes, resfriados, tosses, bronquite, contusões, hemorroidas e infecções do útero (MARTINS et al., 2000). É a representante do gênero *Vernonia* regulamentada para o uso medicinal, no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira com a função de expectorante do chá de suas folhas secas (BRASIL, 2011).

Essa função pode estar associada à composição do seu óleo essencial que apresenta monoterpenos, óxidos sesquiterpênicos (PROBST, 2012; SILVA, 2010; SILVA et al., 2015), tendo maior porcentagem de biciclogermacreno e germacreno D. Essa informação é relevante pois é descrita na literatura a associação entre monoterpenos com a atividade expectorante (WHO, 2009).

As porcentagens de compostos secundários, como os óleos essenciais e polifenóis podem ocorrer em diferentes níveis (sazonais e diárias; intraplanta, inter- e intraespecífica) nas espécies e, apesar de haver um controle genético, sua expressão sofre modificações resultantes da interação de processos químicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (LINDROTH et al., 1987; HARTMANN, 1996) ressaltando as interações planta/planta, planta/microorganismos, planta/inseto. A composição também pode ser afetada por fatores abióticos. Dentre tais fatores, temos a luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de colheita, densidade de plantio, colheita e a pós-colheita. Esses fatores comumente apresentam correlação entre si e exercem influência conjunta no metabolismo secundário (MORAIS, 2009).

A nutrição, segundo Martins et al. (1995), é um dos que requerem maior atenção, pois o excesso ou a deficiência de algum nutriente pode acometer a produção de substâncias bioativas. A deficiência de nitrogênio pode acarretar em redução no teor de alcalóides em lobélia (*Lobellia inflata* L.), sendo que em papoula (*Papaver somniferum* L.) ocorre o inverso, a morfina aumenta. O déficit de magnésio pode provocar diminuição da clorofila, o que acarreta em menor taxa fotossintética e considerável diminuição de metabolitos secundários (CORRÊA Jr. et al., 1994). Em guaco (*Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker.) constatou-se que a espécie é sensível a elevadas teores de fósforo e de cobre na folha para a produção de cumarina (TEIXEIRA, 2017). Assim, os efeitos da adubação variam conforme a espécie e conforme as variáveis estudadas.

Grande parte dos solos brasileiros é descritos como ácidos os que pode dificultar a produção de grande parte das espécies. Apresentam alta saturação por alumínio e baixo teor de cálcio e magnésio trocáveis, íons responsáveis pelo desenvolvimento do sistema radicular. Tendo em vista essas questões, uma forma de diminuir esse impacto na produção é fazer a correção dessa acidez através da adição de calcário (GOEDERT et al., 1991). O calcário usado de forma correta contribui para disponibilidade da maioria dos nutrientes, estimula a atividade microbiana e melhor

fixação de nitrogênio pela simbiose com leguminosas (ALVAREZ-VENEGAS; RIBEIRO, 1999). Porém, o excesso pode acarretar e comprometer a produção, causando baixa disponibilidade dos micronutrientes, sendo um problema mais complexo de se resolver (SOUSA et al., 2007).

Pelo assa-peixe ser uma planta que não possui estudos nessa área, e tendo em vista a importância de um protocolo de cultivo, o trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da calagem e da adubação orgânica na produtividade e na produção de compostos bioativos.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Localização e caracterização geral dos experimentos

Os experimentos foram desenvolvidos na Fazenda Experimental Lageado, da Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP - Campus de Botucatu. A fazenda está localizada no município de Botucatu/SP situada entre os paralelos 22° 30' a 23° 05' de latitude sul e os meridianos de 48° 15' a 48° 52' de longitude oeste, com altitude média de 830 m. O clima é classificado como Cfa, clima temperado quente (mesotérmico) úmido, com temperatura média do mês mais quente superior a 22°C. conforme classificação de Köppen (1936). O solo é caracterizado como latossolo vermelho distrófico de textura média, com porcentagem de argila de 30-35% e areia 15%. Os experimentos foram conduzidos no período de junho de 2018 a maio de 2019, em condições de casa de vegetação com sombreamento de 50 % pelo uso de tela plástica preta tipo "sombrite".

A produção de mudas foi realizada por propagação vegetativa por meio de estacas de 7 cm de comprimento obtidas de plantas de um jardim clonal. As estacas foram plantadas em tubetes com substrato Carolina Soil e ficaram em ambiente com nebulização por 60 dias. Após, foram acondicionadas em túneis agrícolas cobertos para aclimação para posterior transplante para vasos de 14,3 litros e submetidos aos tratamentos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado sendo para adubação cinco tratamentos e cinco repetições e calagem cinco tratamentos e seis repetições.

Para a adubação, os tratamentos foram doses de composto orgânico esterco de curral curtido (Tabela 1). Os tratamentos consistiram em T1: 3 kg m⁻² T2: 6 kg m⁻² T3: 9 kg m⁻² T4: 12 kg m⁻² e T5: 0 kg m⁻² (testemunha). Para calagem, os

tratamentos consistiram em níveis de calcário (PRNT 85,5%) tendo como base a análise de solo (Tabela 2). Não houve adição de nenhuma dose de adubação. Os tratamentos consistiram em T1: V% de 29 (solo sem adição de calcário), T2: V% de 45, T3: V% de 60, T4: V% de 75 e T5: V% de 90.

Os cálculos para obter os valores de V% seguem a seguinte fórmula:

$$NC(t/ha) = [(CTC(v2 - v1) * (100/PRNT)]/100$$

Onde: NC= necessidade de calcário,

CTC= capacidade de troca de cátions em cmolc/dm³

V2 = Porcentagem de saturação por bases desejada;

V1 = Porcentagem de saturação por bases atual do solo (encontrada na análise do solo);

PRNT = Poder Relativo de Neutralização Total (encontrado na embalagem do calcário).

A saturação por bases desejada (V2) pode variar de 50 a 70%, sendo em geral: 50% para cereais e tubérculos; 60% para leguminosas e cana-de-açúcar e utilizado no Cerrado; 70% para hortaliças, café e frutas.

Tabela 1- Análise do composto orgânico esterco de curral curtido

AMOSTRA(S)		N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Ca	Mg	S	Umidade	M.O.	C.O.	Na	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Rel. C/N	pH
Lab.	Amostra	* % (ao natural)								seca	* mg/kg (ao natural)						ao natural	
500	1	0,97	0,67	1,37	1,03	0,88	0,26	39	38	34	1160	---	31	4761	304	111	22/1	8,9

Fonte: Laboratório de Fertilizantes e Corretivos do Departamento de Solos e Recursos Ambientais, Setor de Ciências dos Solos FCA/UNESP-Botucatu, SP.

Tabela 2- Análise química do solo utilizado no experimento

AMOSTRA(S)			pH	pH	M.O.	P _{resina}	Al ³⁺	H+Al	Na	K	Ca	Mg	SB	CTC	V%	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn	
Laboratório	Int.	Faz.	Prof.	CaCl ₂	H ₂ O	g/dm ³	mg/dm ³	mmol/dm ³							mg/dm ³							
HS 195	1			4,4	-	21	5	3	36	-	1,4	10	3	14	51	29	10	0,21	2,3	74	6,3	0,8

Fonte: Laboratório de Fertilizantes e Corretivos do Departamento de Solos e Recursos Ambientais, Setor de Ciências dos Solos FCA/UNESP-Botucatu, SP

As metodologias utilizadas para análise do composto orgânico e do solo seguiram o método espectrofotométrico de absorção atômica e de colorimetria azometina (MALAVOLTA et al., 1997; RAIJ et al., 2001).

Características biométricas

Foram avaliadas as seguintes características: massa seca de raízes (MSR) e folhas (MSF), altura das plantas (ALT), comprimento da maior raiz (CR), volume da raiz (VR) diâmetro do caule (D) e número de folhas (NF). A biomassa seca foi obtida por meio de secagem em estufa de circulação de ar forçada a 45°C, até atingir peso constante. A ALT, CR e D foram obtidas com auxílio de fita métrica e expressas em centímetros. O volume da raiz foi determinado pela alteração do volume utilizando proveta graduada e expresso em mililitros (mL).

Teor de óleo Essencial

O óleo essencial das folhas foi extraído pelo processo de hidrodestilação em aparato do tipo Clevenger. Foram utilizados 40 gramas de biomassa seca das folhas em 1,5L de água destilada em balão de 2L, por 105 minutos (GOMES, 2017). O teor foi determinado com base em 100 gramas de biomassa seca de folhas seguindo a fórmula abaixo:

$$\text{Teor de óleo (\%)} = (\text{massa do óleo (g)} / \text{massa folhas(g)}) \times 100$$

Análise da composição química do óleo essencial

A análise da composição química do óleo essencial foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais, do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agrônomo, Campinas-SP. A análise quantitativa da composição química foi realizada por meio de cromatografia a gás com detector de ionização de chama (CG-DIC, Shimadzu, GC2010/AOC-20i), dotado de coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), hélio como gás de arraste, vazão de 1,0 mL min⁻¹, injetor a 240°C, detector a 230°C, split 1/20 e o seguinte programa de temperatura: 60°C - 120°C, 8°C/min.; 120°C - 200°C, 3°C/min.; 200°C - 240°C, 8°C/min.; split: 1/20. A análise qualitativa da composição

química dos óleos essenciais foi conduzida em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-5000), operando a 70 eV, dotado de coluna capilar de sílica fundida OV-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), hélio como gás de arraste (1,0 mL min⁻¹), split: 1/20, injetor a 220°C, detector a 230°C e o seguinte programa de temperatura: 60°C - 240°C 230°C, 3°C min⁻¹. A identificação dos constituintes químicos foi efetuada por meio da análise comparativa dos espectros de massas das substâncias com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist 62.lib), literatura e índice de retenção linear (LRI) das substâncias com os obtidos por meio da injeção de uma serie homóloga de n-alcanos no programa de temperatura anteriormente descrito, aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963; ADAMS, 2007).

Atividade antioxidante pelo método do DPPH

Para avaliação da atividade antioxidante foi utilizado o método sequestrador de radicais livres DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila – Alfa Aesar 95% de pureza) descrito por Yopez et al. (2002) com pequenas modificações. Pesou-se aproximadamente 0,2 g da amostra seca e moída. Adicionou-se 10 mL de metanol a 80%, em seguida o extrato foi deixado em banho ultrassônico com aquecimento (Eco-Sonics) a 40°C por 15 minutos e centrifugado por 30 minutos a 4000 rpm (Centrífuga Clínica - 80-2B). Transferiu-se para tubo de ensaio, em triplicata, uma alíquota de 0,3 mL do extrato e posteriormente adicionados 2,7 mL da solução de DPPH 0,09 mM. Após 45 minutos ao abrigo da luz, realizou-se a leitura a 517 nm em espectrofotômetro UV-mini 1240 (Shimadzu-Co). Os resultados foram expressos em porcentagem de sequestro de radical livre (%ASRL), mensurada a partir do decréscimo da absorbância das amostras analisadas em relação à solução de DPPH.

A atividade sequestrante (%ASRL) ou porcentagem de descoloração (% descoloração) pode ser expressa em porcentagem por comparação a um controle ou branco, segundo a seguinte equação:

$$\%ASRL = \% \text{ Descoloração} = \frac{Ac - At}{Ac} * 100$$

Onde, Ac: absorbância controle ou branco; At: absorbância teste (amostra).

Extração de taninos solúveis

Para extração de taninos solúveis foi utilizado o método descrito por Taira (1996) com adaptações. Para produção do extrato pesou-se aproximadamente 0,1 g da amostra seca e moída e adicionou-se 12,5 mL de metanol a 80%. Em seguida o extrato foi deixado em banho ultrassônico de 40°C por 20 minutos e centrifugado por 30 minutos a 4000 rpm. Verteu-se o sobrenadante para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com água deionizada. Em tubo de ensaio, em triplicata, adicionou-se 6 ml de água deionizada, 0,3 mL, 0,5 mL do reagente Folin Ciocalteu (1:1) e 1 mL de carbonato de sódio supersaturado (25%). As amostras foram homogeneizadas e após 60 minutos ao abrigo da luz, realizou-se a leitura a 725 nm em espectrofotômetro UV-mini 1240 (Shimadzu-Co). Uma amostra em branco foi conduzida nas mesmas condições e os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico. A curva analítica foi preparada com alíquotas de 10-100 µL da solução de ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxibenzóico PAA - Dinâmica).

Teor de cumarina

Folhas foram secas e moídas em moinho de facas. Para a preparação do extrato bruto, utilizou-se 0,2 g de material vegetal em pó, acrescido de 10 ml de metanol 80%. A solução foi levada para banho ultrassônico com aquecimento (Eco-Sonics) por 30 minutos e posteriormente centrifuga (Centrífuga Clínica - 80-2B) por mais 30 minutos. Para quantificação de cumarina, 0,5 mL do extrato bruto foi transferido para um tubo de ensaio. A seguir, 2 mL de água destilada e 0,5 mL de solução de acetato de chumbo (5%) foi adicionado. A amostra foi agitada e, em seguida, 7 mL de água destilada foram adicionados. Transferiu-se 2 mL desta solução para um novo tubo de ensaio e a adicionou-se de 8 mL de solução de ácido clorídrico (0,1N). A amostra permaneceu à temperatura ambiente ao abrigo da luz durante 30 minutos. O espectrofotômetro UV-mini 1240 (Shimadzu-Co) foi ajustado no comprimento de onda 320 nm. A análise foi realizada em triplicata, e o teor total de cumarina expressa em miligramas equivalentes de cumarina por 100 gramas de massa seca. A curva de calibração foi preparada com alíquotas de 50-500 µL da solução de cumarina (1,2-benzopirona produzido pela empresa Sigma-Aldrich, com pureza de 99,9%), 2 mL de água destilada e 500 µL da solução de acetato de

chumbo. Essa solução foi agitada e o volume final ajustado para 10 mL com água destilada. Dessa solução, transferiu-se uma alíquota de 2 mL desta para um novo tubo de ensaio e adicionou-se de 8 mL de ácido clorídrico 0,1N, conforme metodologia de Cavalcanti de Amorim (2012) com adaptações.

Análise estatística

Para o experimento da calagem, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade através do programa computacional SISVAR (FERREIRA, 2011). Para a adubação, foram submetidos a análise de variância e as características que apresentaram diferenças significativas foram realizadas análises de regressão e as equações ajustadas aos dados.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito significativo da adubação no volume da raiz e na massa seca da raiz (Tabela 3). Ambas variáveis desenvolveram tendência quadrática (Figura 1 e 2). Para as demais características (altura, diâmetro, número de folhas, massa seca das folhas e comprimento de raiz) não houve efeito significativo.

Tabela 3 - Resumo da análise de variância para as características altura de plantas (cm), diâmetro do caule (cm), número de folhas, massa seca das folhas (g), comprimento da raiz (CR), Volume de raiz (mL) e massa seca de raiz (g) submetidas a diferentes doses de composto orgânico

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios						
		Altura	Diâmetro do caule	Número de Folha	Massa seca Folhas	Comprimento da raiz	Volume de raiz	Massa seca Raiz
Dose de Adubação	4	0,088 ^{ns}	12,881 ^{ns}	2,752 ^{ns}	13,099 ^{ns}	128,96 ^{ns}	27281,0*	6266,77**
Erro	20	0,135	8,266	2,439	4,750	154,0	8696,0	485,84
Total	24							
CV(%)		21,20	26,09	18,63	20,28	25,37	31	19,23

^{ns} Não significativo

*Significativo a 5% de probabilidade

**Significativo a 1% de probabilidade

Figura 1 - Volume de raiz de assa-peixe submetidas a diferentes níveis de adubação com esterco de curral curtido

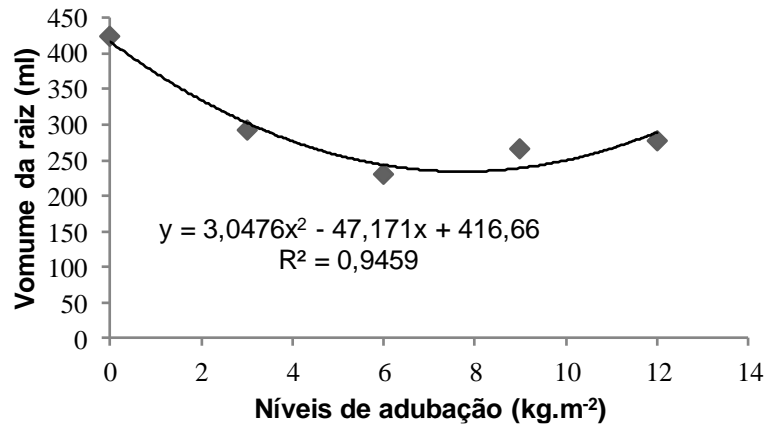
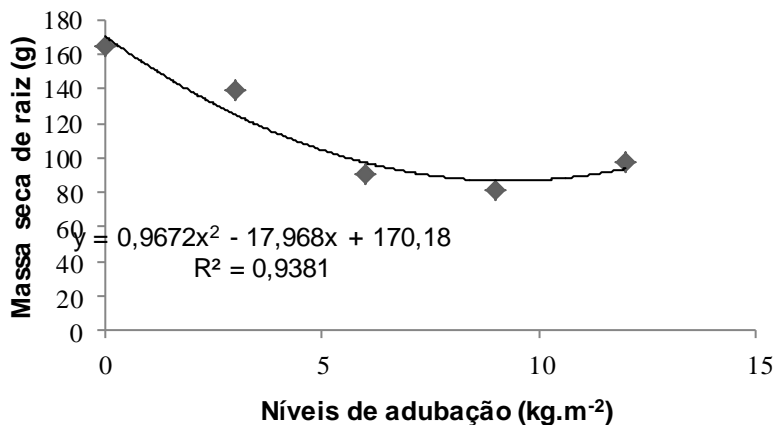


Figura 2 - Massa seca de raiz de assa-peixe submetidas a diferentes níveis de adubação com esterco de curral curtido



As plantas que não receberam nenhuma adubação obtiveram os maiores valores tanto para volume de raiz quanto para massa seca da raiz. Fageria e Stone (2006) e Fageria e Moreira (2011) afirmam que o padrão de enraizamento está sob controle genético, porém o crescimento das raízes pode ser modificado por características químicas e físicas do solo.

A baixa mobilidade de fósforo nos solos pode levar a planta a realizar adaptações na arquitetura do sistema radicular como no padrão das ramificações, aumento no crescimento radicular, no comprimento das raízes, alongamento de pelos e na formação de raízes secundárias (LYNCH, 1995; LYNCH 1998; BATES; LYNCH, 1996; LÓPEZ-BUCIO et al., 2002). Como resposta a esse desbalanço,

ocorre à canalização de energia e carbono para que ocorra a formação de um sistema radicular eficiente e capaz de explorar esse solo (NIELSEN et al., 1998; SCHACHTMAN et al., 1998; LÓPEZ-BUCIO et al., 2000).

Para a adubação o rendimento (%) do óleo essencial foi de 0,1529 (0 kg m⁻²); 0,3215 (3 kg m⁻²); 0,3576 (6 kg m⁻²); 0,4394 (9 kg m⁻²) e 0,1683 (12 kg m⁻²). O maior e menor nível de adubação obteve o menor teor. A dose de 9 kg m⁻² obteve maior teor.

Na composição do óleo foram identificadas 13 substâncias, a maioria sesquiterpenos, com exceção do <β->Pineno (Tabela 4). Os três compostos majoritários encontrados foram Germacreno D, <(E)-> Cariofileno e <α->Humuleno.

Tabela 4 - Substâncias identificadas e suas proporções relativas (%) em amostras de óleo essencial de assa-peixe submetidas a adubação orgânica

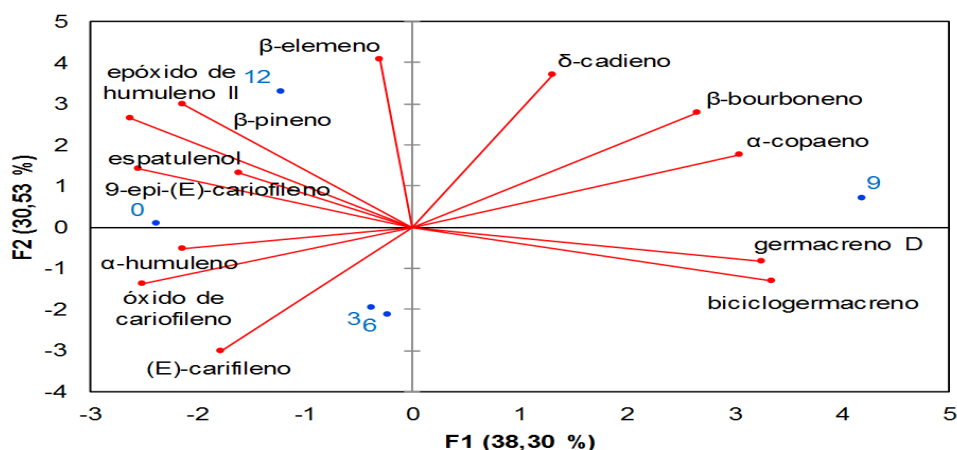
Substância	T1	T2	T3	T4	T5	IRc	IRI
<β->Pineno	1,7	1,39	1,67	0,95	3,38	977	974
<α->Copaeno	5,02	6,09	5,84	7,08	6,59	1377	1374
<β->Bourboneno	1,42	1,35	1,2	1,85	1,57	1386	1387
<β->Elemeno	8,45	8,17	7,08	8,64	10,15	1393	1389
<(E)->Cariofileno	16,86	18,98	18,65	15,68	16,98	1420	1417
<α->Humuleno	16,74	19,3	13,15	13,1	15,89	1454	1452
<9-epi-(E)->Cariofileno	2,14	2,19	2,62	1,49	3,18	1461	1464
Germacreno D	22,95	24,9	27,2	27,86	24,75	1481	1484
Biciclogermacreno	8,84	8,89	9,82	13,34	6,49	1497	1500
Espatuleno	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	1578	1577
<δ->Cadieno	1,88	1,88	1,88	1,88	1,88	1524	1522
Oxido de cariofileno	5,14	2,95	5,14	2,49	3,33	1582	1582
Humulemo epoxide II	1,7	-	0,71	-	1,51	1609	1608
Total de substâncias identificadas (%)	88,14	97,92	97,53	97,03	98,61		

T1- 0 kg m⁻², T2- 3kg m⁻², T3- 6 kg m⁻², T4- 9 kg m⁻², T5- 12 kg m⁻²

Os resultados das análises cromatográficas foram submetidos à análise multivariada, pela técnica de Análise por Componentes Principais (PCA), correlacionando e agrupando (Gráfico 1) os dados dos componentes químicos em relação a seus percentuais mássicos. A análise dos dados químicos pela técnica de PCA permitiu agrupar quimicamente as amostras em quatro grupos de modo a expressar e evidenciar suas semelhanças e diferenças. Os dados para o óleo essencial de assa-peixe, presentes no gráfico 1 representada por dois eixos, apresentam 68,83% da variância total acumulada (Fator 1: 38,30% - CP 1; Fator 2:

30,53% - CP 2). Esse valor percentual indica a porcentagem do quanto está correto o agrupamento, pois quanto maior o fator melhor é a resolução e menor será a perda de informações de dados durante o agrupamento das amostras (NETO, 2010).

Gráfico 1 - Resultante do PCA para as análises cromatográficas do óleo essencial de assa-peixe para as doses de adubação



Para os compostos bioativos, taninos e cumarina, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 5). Para a atividade antioxidante a maior porcentagem de captura de radicais livres (88%) foi alcançada com a maior dose de adubação, 12 kg. m⁻² (Figura 3).

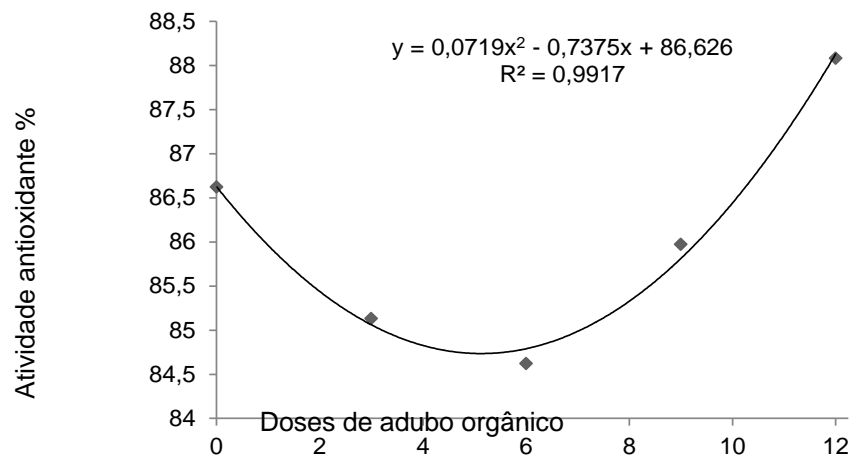
Esses resultados mostram que a adubação orgânica está diretamente relacionada à produção dos metabólitos secundários avaliados. A adubação orgânica aumenta a capacidade de troca catiônica do solo, elevando o pH e reduzindo o teor de alumínio trocável, aumenta a disponibilidade de nutrientes e contribui para a sanidade do vegetal, por diversificar a produção de substâncias ativas como fenóis e de antibióticos por bactérias (KIEHL, 2008).

Tabela 5 - Resumo da análise de variância para atividade antioxidante (AA) %, conteúdo de taninos (mg EAG 100g⁻¹ de massa seca) e cumarinas (mg EqC 100g⁻¹ de massa seca) submetidas a diferentes doses de adubo orgânico

Fonte de Variação	GL	Quadrado médio		
		AA	Taninos	Cumarina
Dose de adubação	4	9.153**	3542.12528 ^{ns}	308030.25 ^{ns}
Erro	20	1.8300	7373.614703	206145.044
Total	24			
CV(%)		1,57	48,6	40,53
Média geral		86,0	178,7	1120,1

^{ns} Não significativo **Significativo a 1% de probabilidade

Figura 3 - Atividade antioxidante em diferentes níveis de adubação orgânica



Esse comportamento pode ser explicado pois espécies submetidas a altas taxas de compostos nitrogenados, especialmente em altas doses, contribuem para aumento da concentração de carotenoides que estão relacionadas a atividade antioxidante (MOZAFAR, 1993).

Para os níveis de calcário, houve efeito significativo para número de folhas (NF), massa seca de folhas (MSF) e volume de raízes (V) (Tabela 5). Para essas características os melhores níveis foram V% de 75 e 90 para NF, V% de 90 para MSF e V (Tabela 6). Para as demais características (altura, diâmetro, comprimento de raiz e massa seca da raiz) não houve efeito significativo.

Tabela 6 - Resumo da análise de variância para as características altura de plantas (cm), diâmetro do caule (cm), número de folhas, massa seca das folhas (g), comprimento da raiz (CR), Volume de raiz (ml) e massa seca de raiz (g) submetidas a diferentes níveis de calcário

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios						
		Altura	Diâmetro do caule	Número de Folha	Massa seca Folhas	Comprimento da raiz	Volume de raiz	Massa seca Raiz
Níveis de calcário	4	0,13 ^{ns}	1041,86 ^{ns}	12,53*	26,28**	342,08 ^{ns}	18791,4**	766,4 ^{ns}
Erro	25	0,06	633,58	3,53	5,80	159,83	4126,3	437,3
Total	29							
CV(%)		15,32	40,36	19,4	26,42	23,83	25,82	20,63

^{ns} Não significativo *Significativo a 5% de probabilidade **Significativo a 1% de probabilidade

Tabela 7 - Valores médios para número de folhas, massa seca das folhas (g) e volume de raiz (ml) de assa-peixe submetidas a níveis de calagem

Níveis de calagem (V%)	Número de folhas	Massa seca de folhas	Volume de raiz
29	7,44 b	7,10 b	193,3 b
45	9,26 ab	8,09 b	223,3 b
60	9,86 ab	8,11 b	235,5 ab
75	10,78 a	9,74 ab	250 ab
90	11,08 a	12,47 a	241,6 a

-Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si

Com a calagem, ocorre elevação do pH, redução do alumínio trocável, fornecendo ainda cálcio e magnésio e aumentando a disponibilidade de nitrogênio, fósforo e potássio, melhorando a eficiência de uso dos nutrientes e da água no solo (RAIJ, 2011). Geralmente as espécies nativas do Cerrado respondem positivamente ao V% de 60 aumentando produção de folhas e raízes, incrementando na biomassa (VIEIRA et al., 2011).

Diferente do experimento com adubação, os teores foram bem inferiores. O menor V% (29) obteve o maior teor de 0,1587. Para V% 45 o teor e de 90 os teores foram os de menor valor 0,0410 e 0,0412 respectivamente. Para V% de 60 foi de 0,1083 e 75 0,0927.

A composição do óleo essencial para os níveis de calagem teve como majoritário os mesmos compostos do experimento da adubação, porém para o V% de 60 não foram detectados β-pineno, espatulenol e humuleno epoxide II (Tabela 8).

O composto α -humuleno é um sesquiterpeno responsável pela atividade anti-inflamatória do óleo essencial da erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.) e a porcentagem relativa encontrada nessa espécie varia de 3,3 % a 4,8 (CARVALHO JUNIOR et al., 2004; RODRIGUES et al., 2012), valores superiores ao teor mínimo (2,3%) necessário para o uso como matéria-prima em medicamentos fitoterápicos (QUISPE-CONDORI et al., 2008). Os valores de α -humuleno encontrados no assa-peixe são superiores ao teor mínimo e também ao encontrado na erva-baleeira, para calagem e adubação os teores relativos estão acima dos 13%.

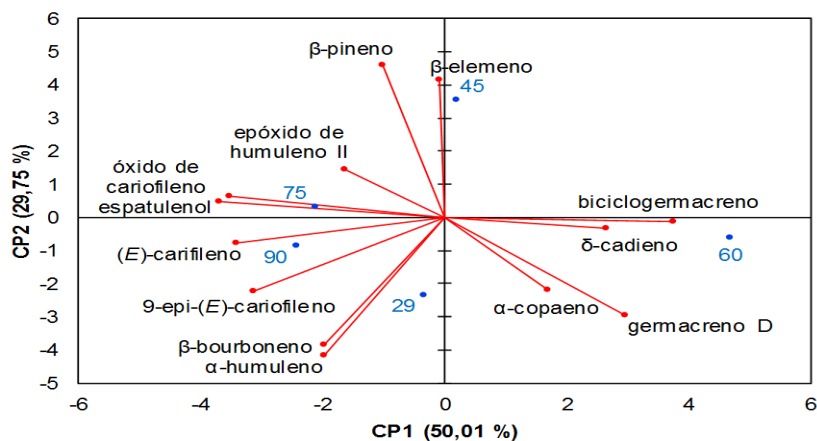
Tabela 8 - Substâncias identificadas e suas proporções relativas (%) em amostras de óleo essencial de assa-peixe submetidas a níveis de calagem

Substância	T1	T2	T3	T4	T5	IRc	IRI
< β ->Pineno	0,6	3,32	-	1,55	1,39	977	974
< α ->Copaeno	7,3	6,99	8,05	7,74	7,48	1377	1374
< β ->Bourboneno	1,56	1,43	1,5	1,55	1,61	1386	1387
< β ->Elemeno	10,34	12,28	11,5	11,58	11,73	1393	1389
<(E)->Cariofileno	16,04	15,85	15,24	16,46	17,13	1420	1417
< α ->Humuleno	16,04	14,58	15	15,53	15,85	1454	1452
<9-epi-(E)->Cariofileno	3,03	2,42	2,09	2,78	2,88	1461	1464
Germacreno D	27,64	24,71	28,9	24,61	25,42	1481	1484
Biciclogermacreno	8,83	9,22	12,83	7,74	7,71	1497	1500
Espatulanol	2,15	2,08	-	2,45	2,11	1578	1577
< δ ->Cadieno	2,23	2,18	2,22	2,13	2,05	1524	1522
Oxido de cariofileno	2,34	2,34	2,34	2,34	2,34	1582	1582
Humulemo epoxide II	0,64	0,72	-	1,02	-	1609	1608
Total de substâncias identificadas (%)	98,74	98,1	97,33	98,27	98,17		

T1- V% 29, T2- V% 45, T3- V% 60, T4- V% 75, T5-V% 90

Os dados para o óleo essencial de assa-peixe, presentes no gráfico 2 representada por dois eixos, apresentam 79,76% da variância total acumulada (Fator 1: 50,01% - CP 1; Fator 2: 29,75% - CP 2). Esse valor percentual indica a porcentagem do quanto está correto o agrupamento, pois quanto maior o fator melhor é a resolução e menor será a perda de informações de dados durante o agrupamento das amostras (NETO, 2010).

Gráfico 2 - Resultante do PCA para as análises cromatográficas do óleo essencial de assa-peixe para os níveis de calagem



Assim como no experimento da adubação, apenas a atividade antioxidante apresentou diferença estatística. Todos os níveis de calagem apresentaram atividade antioxidante considerada forte (>80%) (Tabelas 9-10). A maioria das espécies arbóreas se desenvolve bem em pH em torno de 5,5. Uma oscilação no pH acima ou abaixo desse valor de acordo com Wang e Frei (2011) pode indicar que a planta está sob condição de estresse.

Tabela 9 - Resumo da análise de variância para atividade antioxidante (AA) %, conteúdo de taninos (mg EAG 100g⁻¹ de massa seca) e cumarinas (mg EqC 100g⁻¹ de massa seca) submetidas a diferentes níveis de calcário

Fonte de Variação	GL	Quadrado médio		
		AA	Taninos	Cumarina
Níveis de calcário	4	4.5525**	41633.6748 ^{ns}	157504.35 ^{ns}
Erro	25	1.0404	30669.1478	71307.2860
Total	29			
CV(%)		1,17	27,58	39,34
Média geral		86,8	634,9	668,9

^{ns} Não significativo **Significativo a 1% de probabilidade

Tabela 10 - Valores médios para atividade antioxidante (AA %) submetidas a níveis de calagem

Níveis de calagem (V%)	Médias
	AA
29	86,4 ab
45	85,9 b
60	86,3 ab
75	87,7 a
90	87,7 a

-Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si

CONCLUSÃO

A espécie é pouco exigente em adubação e responde positivamente ao aumento da saturação por base de 75% e 90%. O composto majoritário do óleo essencial para ambos experimentos foi o Germacreno D. Observou-se atividade antioxidante forte para ambos experimentos.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oils Components by Gas chromatography/Mass Spectrometry**, 4. ed. Illinois USA: Allured Publishing Corporation, 2007. 804 p.

ALVAREZ-VÊNEGAS, V. H.; RIBEIRO, A. C. **Calagem**. In: RIBEIRO, A.C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ VÊNEGAS, V. H. eds. *Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação*. Viçosa: CFSEMG, pp. 43 - 60, 1999.

BATES, T. LYNCH, J.P. Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. **Plant cell and environment**, v. 19, p.529-538, 1996.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. Brasília: ANVISA, 126p. 2011.

CARVALHO JUNIOR, P.M. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 297-301, 2004.

CAVALCANTI DE AMORIM et al. Standard Operating Procedures (SOP) for the Spectrophotometric Determination of Phenolic Compounds Contained in Plant Samples. 2012. **Lastet Research in Quality Control**. Intech, Isin Akyar. 2012.

CORREIA-JUNIOR C; MING LC; SCHEFFER MC. 1994. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2a. ed. Jaboticabal: FUNEP. 162 p.

FAGERIA, N. K.; STONE, L. F. Physical, chemical, and biological changes in the rhizosphere and nutrient availability. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 29, n. 7, p. 1327-1356, 2006.

FAGERIA, N. K; MOREIRA, A. The role of mineral nutrition on root growth of crop plants. **Advances in Agronomy**, New York, v. 110, n. 1, p. 251-331, 2011.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

GOEDERT WJ; SOUZA DMG; SCOLARI DOG. 1991. **Critérios para recomendação de calagem e adubação**. In: OLIVEIRA AJ; GARRIDO WE; ARAUJO JD; LOURENÇO S (Coord.). Métodos de pesquisa em fertilidade do solo. Brasília: EMBRAPA-SEA. p. 363-392

GOMES, J. A. O. **Estudos complementares ao manejo do assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less.): fenologia, fitoquímica, histoquímica, anatomia e variação sazonal em população nativa**. 2017. 88 f. Tese (Doutorado Agronomia/Horticultura)- Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

HARTMANN, T. Global harmonization of herbal health claims. **Entomologia Experimentalis at Applicata**. v.80,p. 177. 1996.

KIEHL, E.J. **Adubação orgânica - 500 perguntas e respostas**. Piracicaba: Degaspari, 2008. 227p.

KÖPPEN, W. **Das geographische System der Klimate**. In: KÖPPEN, W.; GEIGER, R. (Eds): Handbuch der Klimatologie. Berlin: Gebrüder Bornträger, 1936. Banda 1, Parte C, p. 1-44.

LINDROTH, R. L. et al. Seasonal patterns in the phytochemistry of three populus species. ; **Biochemical. Systematics and Ecology**. v.15, p. 681. 1987.

LYNCH, J.P. Root architecture and plant productivity. **Plant Physiology**, v.109, p.7-13, 1995.

LYNCH, J.P.the role of nutrient-efficient crops in modern agriculture. **Journal Crop of Production**, v.1, p. 241-264, 1998.

LÓPEZ-BUCIO, J.L.; MARTÍNEZ DE LA VEJA, O.; GUEVARA-GARCIA, A.; HERRERA- ESTRELLA, L. Enhance phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. **Natural biotechnology**, v. 18, p. 450-453, 2000.

LÓPEZ-BUCIO, J.L.; HERNADEZ- ABREU, E.; SÁNCHEZ- CALDERÓN, L.; NIETO-JACOBO, M.F.; SIMPSON, J.; HERRERA- ESTRELLA, L. Phosphate availability

alters architecture and causes change in hormone sensitivity in the Arabidopsis root system. **Plant Physiology**, v. 129, p.244-256, 2002.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; DE OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do Estado Nutricional das Plantas: princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.

MARTINS, E.R; CASTRO, D.M; CASTELLANI, D.C; DIAS, J.E. **Plantas Medicinais**. Editora UFV(Universidade Federal de Viçosa), 2000.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. 1995. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, Imprensa universitária. 22p.

MORAIS, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, 2009.

MOZAFAR, A. nitrogen fertilizers and the amount of vitamins in plants: A review. **Journal of plant Nutrition**. V. 16, 1993.

NETO, J. M. M. **Estatística Multivariada, Filosofia da Ciência**. Disponível em: <http://criticanarede.com/cien_estatistica.html 8/6/2008> Acesso em: 09 mai. 2004.

NIELSEN, K.L; BOUMA, T.; LYNCH, J.P.; EISSENSTAT, D. Effects of phosphorus availability and vesicular-arbuscular mycorrhizas on carbon budget of common beans (*Phaseolus vulgaris*). **New phytologist**, v. 138, p. 647-656, 1998.

PROBST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. Botucatu, SP: Dissertação de Mestrado apresentada no Instituto de Biociências, UNESP, 2012.

QUISPE-CONDORI, M.A. et al. Obtaining β -caryophyllene from *Cordia verbenacea* de Candolle by supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 46, p. 27-32, 2008.

RAIJ, B.van. et al. **Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais**. IAC, 2001. 285p.

RODRIGUES, F.F.G. et al. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves. **Pharmacognosy Reserarch**, v.4, p. 161-165, 2012.

SCHACHTMAN, D.P.; REID, R.J.; AYLING, S.M. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. **Plant Physiology**, v. 116, p.147-453, 1998.

SILVA, N. C. C. **Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas**. Botucatu, SP: Dissertação de Mestrado apresentada no Instituto de Biociências, UNESP, 2010.

SILVA, J. L.; SOUZA, P. E.; ALVES, E.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FREITAS, M. L. O.; ANDRADE, C. C. L.; RESENDE, M. L. V. Essential oil of *Cymbopogon flexuosus*, *Vernonia polyanthes* and potassium phosphite in control of bean anthracnose. *Ebène, Academic Journals, Journal of Medicinal Plants Research*, v. 9, n. 8, p. 243–253, 2015.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Methods of Enzymology*, New York, v. 299, p. 152-178, 1999.

RAIJ, B.V. (2011) - **Fertilidade do solo e manejo de nutrientes**. Piracicaba, IPNI, 420 p.

SOUSA, D. M. G. de; MIRANDA, L. N de; OLIVEIRA, S. A. de. **Acidez do solo e sua correção**. In NOVAIS, R. F. et al. (Org.) *Fertilidade do Solo*. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, pp. 205-274, 2007

TEIXEIRA, D.A. **Produção de biomassa e teor de cumarina em duas espécies de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip ex Baker) em função da adubação orgânica**. 2017. 60 f. Dissertação (Mestrado Agronomia-Horticultura). Faculdade de Ciências Agrônômicas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, 2017

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, D.J. A generalization of the relation index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*. v.11, p. 463-467, 1963.

VIEIRA, M.C.; PEREZ, V.B.; HEREDIA ZÁRATE, N.A.; SANTOS, M.C.; PELLOSO, I.A.O. & PESSOA, S.M. (2011) - Nitrogênio e fósforo no desenvolvimento inicial da guavira [*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg] cultivada em vasos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, vol. 13, n. esp., p. 542-549.

WANG, Y.; FREI, M. Stressed food – The impact of abiotic environmental stresses on crop quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment*., v.141, p.271-286, 2011.

WHO - **World Health Organization**. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants. v4. Geneva: World Health Organization, 2009. 456p.

CAPÍTULO 2 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ASSA-PEIXE EM FUNÇÃO DA ÉPOCA DE COLHEITA E ESPAÇAMENTO

RESUMO

Vernonia polyanthes (Spreng.) Less.) é popularmente utilizada como planta medicinal para tratamento de afecções do aparelho respiratório, problemas renais, diurética, dentre várias outras. É conhecida também como uma espécie invasora de pastagem, porém, apesar dessa característica há pouca informação sobre a espécie. Tendo em vista sua importância e o fato de a coleta indiscriminada de plantas em seu estado silvestre pode levar à sua extinção, o presente trabalho teve como objetivo avaliar quatro épocas de colheita e sua relação com o teor de compostos bioativos. O experimento foi instalado no Pomar didático do Departamento de Horticultura, localizado na fazenda Lageado no município de Botucatu/SP. As mudas foram transplantadas para covas (20 x 20 x 25 cm, em média), no espaçamento de 1,0 m x 0,5 m. A primeira colheita foi realizada aos 180 dias após o plantio. A segunda aos 240, terceira 300 e a quarta aos 360 DAT totalizando quatro épocas que caracterizaram os tratamentos. Não foi realizada correção do solo. As características avaliadas foram altura de plantas, diâmetro e massa seca de folhas. A melhor época de colheita foi aos 300 DAT. Não houve diferenças significativas entre o teor de óleo. O composto bourboneno foi maior aos 360 DAT e humuleno epoxide II foi maior aos 240 DAT. Não houve diferença para cumarina, taninos e atividade antioxidante. O composto majoritário foi germacreno D. Para o experimento de espaçamento, foram avaliados quatro espaçamentos: 1mx0,5m; 1mx1m; 1mx1,5m e 1mx2m e o teor de óleo essencial, taninos e cumarinas além da atividade antioxidante. As características biométricas avaliadas (altura de plantas, diâmetro do caule e massa seca) não apresentaram diferenças estatísticas. O espaçamento que apresentou melhor resultado foi 1mx2m tanto para as características biométricas, quanto para taninos. O perfil do óleo não se alterou e não houve diferenças estatísticas para teor de cumarina e atividade antioxidante.

Palavras-chaves: Ponto de colheita. Compostos bioativos. *Vernonia polyanthes*.

CHAPTER 2 PRODUCTION AND CHEMICAL COMPOSITION OF ASSA-PEIXE IN HARVEST SEASON AND SPACING

Vernonia polyanthes (Spreng.) Less.) is popularly used as a medicinal plant for the treatment of respiratory tract disorders, kidney problems, diuretics, among many others. It is also known as an invasive grassland species, but despite this feature there is little information about the species. Given their importance and the fact that indiscriminate harvesting of plants in their wild state may lead to their extinction, the present work aimed to evaluate four harvest seasons and their relation with the content of bioactive compounds. The experiment was installed in the Pomar Didático of the Departamento de Horticultura, located at the Fazenda Lageado in Botucatu / SP. The seedlings were transplanted to pits (20 x 20 x 25 cm, on average), spacing 1.0 m x 0.5 m. The first harvest was performed at 180 days after planting. The second at 240, the third at 300 and the fourth at 360 DAT totaling four seasons that characterized the treatments. No soil correction was performed. The evaluated characteristics were plant height, diameter and leaf dry mass. The best harvest time was at 300 DAT. There were no significant differences between oil content. The bourbonene compound was higher at 360 DAT and humulene epoxide II was higher at 240 DAT. There was no difference for coumarin, tannins and antioxidant activity. The major compound was germacrene D. For the spacing experiment, four spacing were evaluated: 1mx0.5m; 1mx1m; 1mx1.5m and 1mx2m and the content of essential oil, tannins and coumarins in addition to antioxidant activity. The biometric characteristics evaluated (plant height, stem diameter and dry mass) did not show statistical differences. The spacing that showed the best result was 1mx2m for both biometric characteristics and tannins. The oil profile did not change and there were no statistical differences for coumarin content and antioxidant activity

Keywords: Harvest point. Bioactive compounds. *Vernonia polyanthes*.

2.1 INTRODUÇÃO

No Brasil, em torno de 20% da população consome 63% dos medicamentos disponíveis, enquanto que o restante encontra nos medicamentos de origem natural, especialmente nas plantas medicinais, a única fonte de recurso terapêutico. Na Alemanha, a medicina alternativa participa com 30% dos medicamentos, enquanto no Brasil calcula-se por volta de 5% (CASTRO, 2003).

Buchanan et al. (2000) denominaram de metabólitos primários os compostos que estão ligados intimamente na nutrição e nos processos metabólicos essenciais dos vegetais, enquanto que os metabólitos secundários foram definidos como os que influenciam nas interações ecológicas entre indivíduos e o ambiente. Pelo processo fotossintético as plantas utilizam a energia solar captada para a produção de compostos orgânicos que são precursores dos metabólitos secundários (CASTRO et al., 2005). Estes, por sua vez, são classificados baseados nas vias

biossintética das quais são derivados e nos principais grupos: os compostos nitrogenados, os terpenos e compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2013).

O assa-peixe (*Vernonia polyanthes* (Spreng.) Less.) que esta presente na lista do RENISUS, é uma planta silvestre nativa do cerrado brasileiro, conhecida como assa-peixe-branco, estaca-sangue, tramanhém, mata-pasto, cambará-guassu, cambará-branco, erva-preá e enxuga (ALZUGARAY; ALZUGARAY, 1984). Tem ampla utilização como medicinal como nos tratamentos de problemas renais, hipertensão, fluxo urinário, úlcera, leishmaniose, febre, hemorragias, infecções do útero, afecções do aparelho respiratório, como bronquites, tosses, gripes e resfriados (RODRIGUES; CARVALHO, 2001; SILVEIRA; FOGLIO; GONTIJO, 2003; SILVEIRA; RÚBIO; ALVES, 2000; BRAGA et al., 2007; BARBASTEFANO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007; LORENZI; MATOS, 2008).

É uma espécie que ocorre de forma espontânea, não tendo na literatura informações sobre um protocolo de cultivo, o que dificulta sua utilização visto que, segundo Gomes (2017) uma época do ano que compreende os meses de maio a setembro, a espécie quase não dispõe de folhas maduras, as quais são utilizadas para os mais diversos usos terapêuticos.

Dentre as técnicas de cultivo, a colheita de espécies medicinais e aromáticas tem algumas particularidades que a torna diferente das outras culturas, uma vez que objetiva conciliar a máxima produção de biomassa com o maior teor de compostos bioativos. Sendo assim, a determinação da época ideal de colheita varia de acordo com o órgão da planta, estágio de desenvolvimento e a época do ano (CORRÊA JÚNIOR ET AL., 1991; MARTINS et al., 1995). Com isso Martins et al. (1995) enfatizam o empirismo existente no que se refere à determinação do momento adequado para colheita de plantas medicinais e aromáticas, enquanto Von Hertwig (1991) recomenda, nas espécies de alto valor comercial, a coleta de amostras espaçadas no tempo, para realização de análises, que identificarão o maior teor de princípios ativos ou o momento propício da colheita.

A época de colheita tem papel importante no rendimento e composição de compostos provenientes do metabolismo secundário. A biossíntese desses compostos pode ser influenciada por fatores climáticos, como fotoperíodo, temperatura, umidade, precipitação e radiação solar, os quais são determinantes para obtenção do princípio ativo de interesse (TAVEIRA et al., 2003).

O espaçamento é outro fator importante, pois está diretamente relacionado ao crescimento e o rendimento final da produtividade de cada indivíduo numa determinada área (YADAVA, 2001). Essa densidade pode também favorecer a competição entre a cultura e entre a cultura e as plantas espontâneas por recursos como água e nutrientes, etc (MONTEIRO et al., 2011).

Para espécies medicinais, a densidade de plantio e a época de colheita podem favorecer ou prejudicar a produtividade, pois se leva em consideração tanto a produção de biomassa quanto a de princípios ativos de interesse. Um levantamento ou conhecimento prévio das condições de cultivo torna-se imprescindível para que essas condições contribuam para o aumento da produção e para qualidade desses compostos (LIMA et al., 2003).

Assim, neste trabalho objetivou-se estabelecer, para o assa-peixe a melhor época de colheita e espaçamento, visando à produção de biomassa seca e compostos bioativos (óleo essencial, cumarina e taninos solúveis) e a atividade antioxidante.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Localização e caracterização geral dos experimentos

A instalação dos experimentos ocorreu na primeira quinzena do mês de junho de 2018 no Pomar didático do Departamento de Horticultura, localizado na fazenda Lageado no município de Botucatu/SP situada entre os paralelos 22° 30' a 23° 05' de latitude sul e os meridianos de 48° 15' a 48° 52' de longitude oeste, com altitude média de 830 m. O clima é classificado como Cfa, clima temperado quente (mesotérmico) úmido, com temperatura média do mês mais quente superior a 22°C. conforme classificação de Köppen (1936). O solo é caracterizado como latossolo vermelho distrófico de textura média, com porcentagem de argila de 30-35% e areia 15%. Dados meteorológicos do local no período do experimento foram obtidos através da Estação meteorológica do Departamento de Solos e recursos Ambientais (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados climáticos de junho de 2018 a maio de 2019 – Botucatu, SP

	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maio
Temperatura média (°C)	18,9	14,8	17,6	19,9	20,2	21,5	23,6	24,8	23,5	21,6	21	20
Umidade relativa do ar (%)	67,8	48,4	69,8	64,3	71,2	74,6	66,7	69,3	74,3	77,5	76,2	75,4
Precipitação (mm)	9,1	0,6	89	54	177	180	112	229	294	149	63	53

Fonte: Estação Meteorológica Fazenda Lageado- Botucatu,SP

As mudas, após a aclimatização, foram levadas para o campo e transplantadas para covas (20 x 20 x 25 cm, em média), adubadas com esterco bovino curtido oriundo de animais não confinados e criados com manejo orgânico (Tabela 2) na quantidade de 3 kg m⁻² previamente homogeneizado, após amostragem da área (Tabelas 3 e 4), no espaçamento de 1,0 m x 0,5 m para o experimento de época de colheita.

Tabela 2 - Análise do composto orgânico

AMOSTRA(S)		N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Ca	Mg	S	Umidade	M.O.	C.O.	Na	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Rel. C/N	pH
Lab.	Amostra	* % (ao natural)								seca	* mg/kg (ao natural)						ao natural	
500	1	0,97	0,67	1,37	1,03	0,88	0,26	39	38	34	1160	---	31	4761	304	111	22/1	8,9

Fonte: Laboratório de Fertilizantes e Corretivos do Departamento de Solos e Recursos Ambientais, Setor de Ciências dos Solos FCA/UNESP-Botucatu, SP

Os tratos culturais antes da implantação e durante o experimento foram irrigações diárias de forma manual e capina manual. Nas épocas indicadas como tratamento, procedeu-se ao arranquio manual das plantas com auxílio de tesoura de poda. Em seguida as folhas foram separadas manualmente e levadas para estufa de circulação de ar forçado a 40°C por 48h até atingirem peso constante. Foram avaliadas as características: altura da planta (cm); diâmetro do caule, massa seca das folhas (t ha⁻¹). Posteriormente, realizaram-se a determinação da biomassa seca da parte aérea, a extração e a determinação dos compostos bioativos.

Tabela 3 - Análise química inicial do solo da área experimental do Pomar didático, na profundidade de 0-20 e 20-40 cm, Botucatu, SP

Amostra (cm)	pH	M.O.	P _{resina}	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	V%	S
	CaCl ₂	g dm ⁻³	mg dm ⁻³	----- mmol _e dm ⁻³ -----							mg dm ⁻³
0-20	6,0	7	4	11	0,9	17	9	27	38	71	3
20-40	5,3	5	3	15	0,7	14	8	23	38	60	6

Fonte: Laboratório de Fertilizantes e Corretivos do Departamento de Solos e Recursos Ambientais, Setor de Ciências dos Solos FCA/UNESP-Botucatu, SP

Tabela 4 - Análise química do solo (micronutrientes) da área experimental do Pomar didático, na profundidade de 0-20 e 20-40 cm, Botucatu, SP

Amostra (cm)	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	----- mg dm ⁻³ -----				
0-20	0,18	0,7	13	9,1	0,6
20-40	0,20	0,7	10	3,4	0,7

Fonte: Laboratório de Fertilizantes e Corretivos do Departamento de Solos e Recursos Ambientais, Setor de Ciências dos Solos FCA/UNESP-Botucatu, SP

A primeira colheita foi realizada aos 180 dias após o plantio. A segunda aos 240, terceira 300 e a quarta aos 360 DAT totalizando quatro épocas que caracterizaram os tratamentos. Cada um com 10 plantas por parcela. O espaçamento utilizado foi de 1,0 m x 0,5 m. A adubação foi realizada com esterco de curral curtidos sendo 3 kg m⁻² por cova. Não foi realizada correção do solo.

Para o experimento de espaçamento, a implantação seguiu as mesmas condições do experimento para época de colheita. O cultivo de assa-peixe foi realizado em quatro espaçamentos (1,0 m x 0,5 m; 1,0 m x 1,0 m; 1,0 m x 1,5 m; 1,0 m x 2,0 m) em cinco blocos com 12 plantas por parcelas, sendo avaliadas as quatro plantas centrais. As características avaliadas foram altura de plantas, diâmetro do caule e massa seca de folhas.

Teor de óleo Essencial

O óleo essencial das folhas foi extraído pelo processo de hidrodestilação em aparato do tipo Clevenger. Foram utilizados 40 gramas de biomassa seca das folhas em 1,5L de água destilada em balão de 2L, por 105 minutos (GOMES, 2017). O teor foi determinado com base em 100 gramas de biomassa seca de folhas, seguindo a formula abaixo:

$$\text{Teor de óleo (\%)} = (\text{massa do óleo (g)} / \text{massa folhas(g)}) \times 100$$

Análise da composição química do óleo essencial

A análise da composição química do óleo essencial foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais, do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas-SP. A análise quantitativa da composição química foi realizada por meio de cromatografia a gás com detector de ionização de chama (CG-DIC, Shimadzu, GC2010/AOC-20i), dotado de coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), hélio como gás de arraste, vazão de 1,0 mL min^{-1} , injetor a 240°C, detector a 230°C, split 1/20 e o seguinte programa de temperatura: 60°C - 120°C, 8°C/min.; 120°C - 200°C, 3°C/min.; 200°C - 240°C, 8°C/min.; split: 1/20; fluxo: 1,0 ml/min. A análise qualitativa da composição química dos óleos essenciais foi conduzida em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-5000), operando a 70 eV, dotado de coluna capilar de sílica fundida OV-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), hélio como gás de arraste (1,0 mL min^{-1}), split: 1/20, injetor a 240°C, detector a 230°C e o seguinte programa de temperatura: 60°C - 240°C 230°C, 3°C min^{-1} . A identificação dos constituintes químicos foi efetuada por meio da análise comparativa dos espectros de massas das substâncias com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist 62.lib), literatura e índice de retenção das substâncias com os obtidos por meio da injeção de uma serie homóloga de n-alcanos no programa de temperatura anteriormente descrito, aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL E KRATZ, 1963; ADAMS, 2007).

Atividade antioxidante pelo método do DPPH

Para avaliação da atividade antioxidante foi utilizado o método sequestrador de radicais livres DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila – Alfa Aesar 95% de pureza) descrito por Yopez et al. (2002) com pequenas modificações. Pesou-se aproximadamente 0,2 g da amostra seca e moída. Adicionou-se 10 mL de metanol a 80%, em seguida o extrato foi deixado em banho ultrassônico com aquecimento (Eco-Sonics) a 40°C por 15 minutos e centrifugado por 30 minutos a 4000 rpm (Centrífuga Clínica - 80-2B). Transferiu-se para tubo de ensaio, em triplicata, uma alíquota de 0,3 mL do extrato e posteriormente adicionados 2,7 mL da solução de

DPPH 0,09 mM. Após 45 minutos ao abrigo da luz, realizou-se a leitura a 517 nm em espectrofotômetro UV-mini 1240 (Shimadzu-Co). Os resultados foram expressos em porcentagem de sequestro de radical livre (%ASRL), mensurada a partir do decréscimo da absorbância das amostras analisadas em relação à solução de DPPH.

A atividade sequestrante (%ASRL) ou porcentagem de descoloração (% descoloração) pode ser expressa em porcentagem por comparação a um controle ou branco, segundo a seguinte equação:

$$\%ASRL = \% \text{ Descoloração} = \frac{Ac - At}{Ac} * 100$$

Onde, Ac: absorbância controle ou branco; At: absorbância teste (amostra).

Extração de taninos solúveis

Para extração de taninos solúveis foi utilizado o método descrito por Taira (1996) com adaptações. Para produção do extrato pesou-se aproximadamente 0,1 g da amostra seca e moída e adicionou-se 12,5 mL de metanol a 80%. Em seguida o extrato foi deixado em banho ultrassônico de 40°C por 20 minutos e centrifugado por 30 minutos a 4000 rpm. Verteu-se o sobrenadante para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com água deionizada. Em tubo de ensaio, em triplicata, adicionou-se 6 ml de água deionizada, 0,3 mL, 0,5 mL do reagente Folin Ciocalteu (1:1) e 1 mL de carbonato de sódio supersaturado (25%). As amostras foram homogêneas e após 60 minutos ao abrigo da luz, realizou-se a leitura a 725 nm em espectrofotômetro UV-mini 1240 (Shimadzu-Co). Uma amostra em branco foi conduzida nas mesmas condições e os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico. A curva analítica foi preparada com alíquotas de 10-100 µL da solução de ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxibenzóico PAA - Dinâmica).

Teor de cumarina

Folhas foram secas e moídas em moinho de facas. Para a preparação do extrato bruto, utilizou-se 0,2 g de material vegetal em pó, acrescido de 10 ml de metanol 80%. A solução foi levada para banho ultrassônico com aquecimento (Eco-

Sonics) por 30 minutos e posteriormente centrifuga (Centrífuga Clínica - 80-2B) por mais 30 minutos. Para quantificação de cumarina, 0,5 mL do extrato bruto foi transferido para um tubo de ensaio. A seguir, 2 mL de água destilada e 0,5 mL de solução de acetato de chumbo (5%) foi adicionado. A amostra foi agitada e, em seguida, 7 mL de água destilada foram adicionados. Transferiu-se 2 mL desta solução para um novo tubo de ensaio e a adicionou-se de 8 mL de solução de ácido clorídrico (0,1N). A amostra permaneceu à temperatura ambiente ao abrigo da luz durante 30 minutos. O espectrofotômetro UV-mini 1240 (Shimadzu-Co) foi ajustado no comprimento de onda 320 nm. A análise foi realizada em triplicata, e o teor total de cumarina expressa em miligramas equivalentes de cumarina por 100 gramas de massa seca. A curva de calibração foi preparada com alíquotas de 50-500 µL da solução de cumarina, 2 mL de água destilada e 500 µL da solução de acetato de chumbo. Essa solução deve ser agitada e o volume final ajustado para 10 mL com água destilada. Dessa solução, transfere-se uma alíquota de 2 mL desta para um novo tubo de ensaio e adiciona-se de 8 mL de ácido clorídrico 0,1N, conforme metodologia de Cavalcanti de Amorim (2012) com adaptações.

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as características que apresentaram diferenças significativas foram realizadas análises de regressão e as equações ajustadas aos dados.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferença significativa para todas as características avaliadas (altura de planta, diâmetro e massa seca de folhas) (Tabela 5). Todas obtiveram resposta quadrática em relação à época de colheita. Para altura de planta a melhor época foi as 342 dias, para o diâmetro aos 275 dias e para massa seca de folhas aos 263 dias de acordo com o ponto de máximo (Figura 1, 2 e 3).

Tabela 5 - Resumo da análise de variância para as características altura de plantas (cm), diâmetro do caule (cm), número de folhas, massa seca das folhas (g)

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios		
		Altura	Diâmetro do caule	Massa seca de folhas
Dias após o plantio	3	11534,09**	131,87**	2119,21*
Erro	36	1935,2	11,81	691,95
Total	39			
CV(%)		27,29	30,35	40,9

*Significativo a 5% de probabilidade **Significativo a 1% de probabilidade

Figura 1 - Altura de planta de assa-peixe submetida a diferentes épocas de colheita

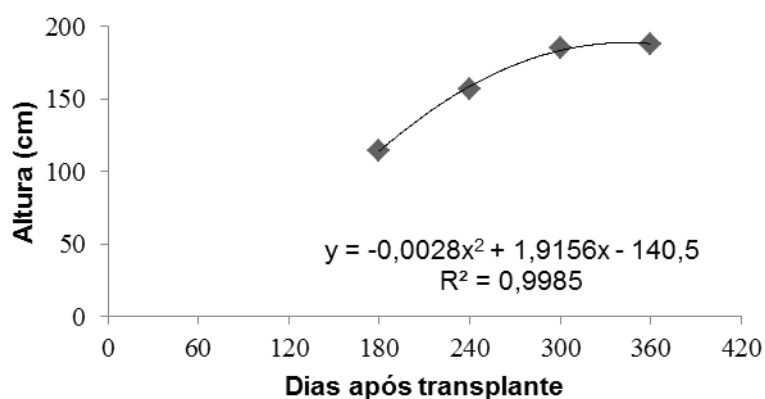


Figura 2 - Diâmetro de planta de assa-peixe submetida a diferentes épocas de colheita

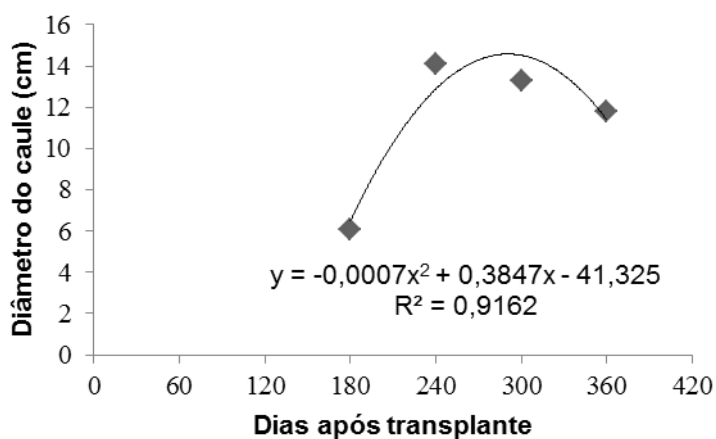
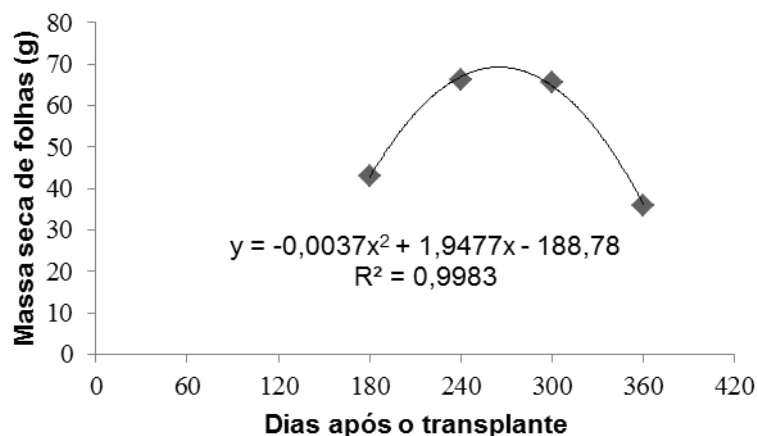


Figura 3 - Massa seca de folhas de assa-peixe submetida a diferentes épocas de colheita



A redução das características avaliadas após os 300 DAT pode estar relacionada ao fato de encontrarem-se no início do período de florescimento, com perda de folhas, pela senescência natural. Há também menor qualidade, no que se refere ao aspecto visual, do material colhido com 360 dias.

Para a época de colheita o rendimento (%) do óleo essencial foi de 0,034 para 180 DAT; 0,064 240 e 300 DAT e 0,074 para 360 DAT, não havendo diferença estatística significativa entre os tratamentos. A composição do óleo essencial de assa-peixe apresenta majoritariamente compostos sesquiterpenoides, exceto o β -pineno (Tabela 6). O composto β -Bourboneno apresentou maior porcentagem relativa aos 360 DAT. O humulemo epoxide II teve maior porcentagem relativa aos 240 DAT. Em trabalho realizado por Gomes (2017) com populações nativas de assa-peixe, observou-se que folhas jovens e expandidas, o componente majoritário encontrado foi o Germacreno-D, o que corrobora com o componente majoritário encontrado neste trabalho em todas as épocas de colheita.

Segundo Leal et al. (2003) o rendimento de óleo essencial decresce em função da idade das plantas, em espécies aromáticas. Em *Lippia alba* os teores variaram com relação à época de colheita, diminuindo à medida em que aumentava o período de colheita com relação à época do plantio. Isso pode ocorrer, pois, conforme as atividades fisiológicas diminuem em direção ao estágio de senescência, cessa a biossíntese de óleo essencial nas partes mais velhas, além de ser promovida a reciclagem do óleo para porções mais jovens da planta, (MING,

1998). Para a grande maioria das espécies que produzem óleos essenciais (não apenas as aromáticas) ocorre um aumento com maior tempo de colheita, antes de haver decréscimo, isso se deve ao fato da planta estar plenamente estabelecida na segunda, ou terceira colheita (SANTOS; INNECCO, 2004), que corrobora com o observado para o assa-peixe.

Tabela 6 - Substâncias identificadas e suas proporções relativas (%) em amostras de óleo essencial de assa-peixe em diferentes épocas de colheita

Substância	T1	T2	T3	T4	IRc	IRI
^{ns} β->Pineno	0,28	1,59	1,46	1,17	977	974
^{ns} α->Copaeno	9,86	8,30	8,75	9,18	1377	1374
**β->Bourboneno	2,09 ab	1,31 b	1,36 b	2,85 a	1386	1387
^{ns} β->Elemeno	4,60	6,46	6,95	6,93	1393	1389
^{ns} (E)->Cariofileno	20,07	20,33	19,80	17,58	1420	1417
^{ns} α->Humuleno	16,72	18,70	15,81	15,14	1454	1452
^{ns} 9-epi-(E)->Cariofileno	1,79	3,07	3,06	2,71	1461	1464
^{ns} Germacreno D	20,55	18,19	18,57	19,53	1481	1484
^{ns} Bicyclogermacreno	8,71	5,91	6,71	8,71	1497	1500
^{ns} Espatuleno	3,74	3,29	4,58	6,60	1578	1577
^{ns} δ->Cadieno	2,28	2,35	2,32	2,40	1524	1522
^{ns} Oxido de cariofileno	3,85	4,83	5,46	5,36	1582	1582
*Humulemo epoxide II	0,80 b	2,57 a	1,65 ab	1,26 ab	1609	1608
Total de substâncias identificadas (%)	98,74	98,1	97,33	98,27		

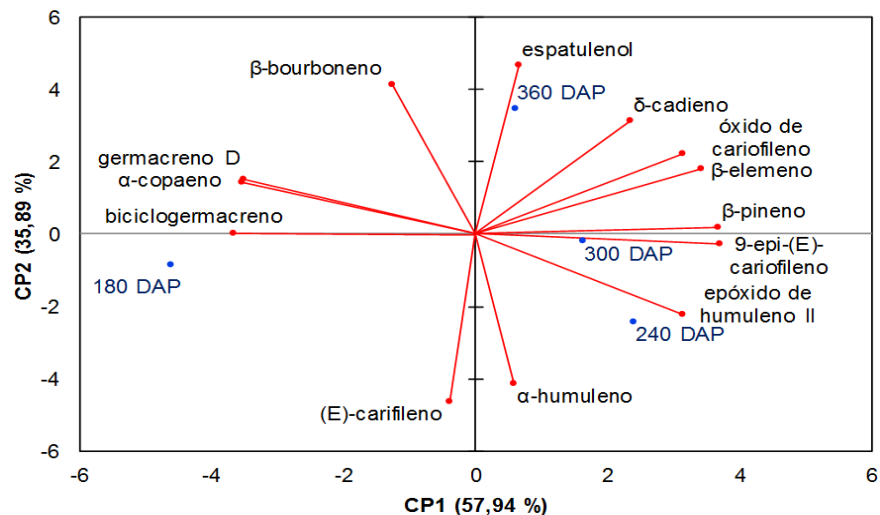
*Significativo a 5% de probabilidade **Significativo a 1% de probabilidade ^{NS} Não significativo

T1- 180 DAT, T2- 240 DAT, T3- 300 DAT, T4- 360 DAT

Os resultados das análises cromatográficas foram submetidos à análise multivariada, pela técnica de Análise por Componentes Principais (PCA), correlacionando e agrupando (Gráfico 1) os dados dos componentes químicos em relação a seus percentuais mássicos. A análise dos dados químicos pela técnica de PCA permitiu agrupar quimicamente as amostras em três grupos de modo a expressar e evidenciar suas semelhanças e diferenças. Os dados para o óleo essencial de assa-peixe, presentes no gráfico 1 representada por dois eixos, apresentam 93,83% da variância total acumulada (Fator 1: 57,94% - CP 1; Fator 2: 35,89% - CP 2). Esse valor percentual indica a porcentagem do quanto está correto o agrupamento, pois quanto maior o fator melhor é a resolução e menor será a

perda de informações de dados durante o agrupamento das amostras (NETO, 2010).

Gráfico 1 - Resultante do PCA para as análises cromatográficas do óleo essencial de assa-peixe para as épocas de colheita



A atividade antioxidante, conteúdo de taninos e cumarinas não apresentaram diferenças estatísticas para as diferentes épocas de colheita (Tabela 7).

Tabela 7 - Resumo da análise de variância para atividade antioxidante (AA) %, conteúdo de taninos (mg EAG 100g⁻¹ de massa seca) e cumarinas (mg EqC 100g⁻¹ de massa seca) em diferentes épocas de colheita

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios		
		AA	Taninos	Cumarinas
Dias após o plantio	3	0.089187 ^{ns}	44517.817 ^{ns}	135763.578 ^{ns}
Erro	16	0.041990	28853.562936	182456.950
Total	19			
CV(%)		0,23	28,6	40,86
Média geral		88,8	594,0	1045,4

^{ns} Não significativo

Em trabalho realizado por Escalada et al. (2011) verificaram que nas colheitas de espécies medicinais próximas ao outono, a concentração de compostos do grupo dos polifenóis foi maior quando comparado com os dados obtidos de colheitas realizadas no verão. Possivelmente, as espécies do estudo tem correlação entre a luminosidade e a produção de compostos do grupo dos polifenóis, o que não foi observado no assa-peixe.

Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007) a intensidade de luz é um fator que influencia no teor de metabólitos secundários em plantas medicinais. De forma geral, há correlação positiva entre intensidade de radiação solar e produção de compostos fenólicos, dentre os quais se enquadram os flavonoides, taninos, cumarinas e antocianinas, porém não há relatos sob que condição climática, época do ano ou região isso é ocorre, o que dificulta a comparação com os dados obtidos.

Para o experimento de densidade de plantio houve diferença significativa para todas as características avaliadas (altura de planta, diâmetro e massa seca de folhas) (Tabela 8).

Tabela 8 - Resumo da análise de variância para as características altura de plantas (cm), diâmetro do caule (cm), número de folhas, massa seca das folhas (g) no experimento de espaçamento

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios		
		Altura de plantas	Diâmetro do caule	Massa seca de folhas
Espaçamento	3	1442.1521**	1.47700*	2833.4606**
Erro	16	228.296120	0.356688	278.275765
Total	19			
CV(%)		15,21	5,20	38,13
Média geral		99,3	11,5	43,7

*Significativo a 5% de probabilidade **Significativo a 1% de probabilidade

Para a massa seca de folhas diâmetro e altura de plantas, o melhor resultado observado foi para o espaçamento 1,0 m x 2,0 m (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores médios para massa seca das folhas (g), diâmetro do caule (cm) e altura de plantas (cm) de assa-peixe na densidade de plantio

Espaçamento entre plantas	Massa seca de folhas	Diâmetro do caule	Altura de plantas
1,0 m x 0,5 m	31,3 b	11,4 b	89,7 b
1,0 m x 1,0 m	26,9 b	10,9 ab	85,1 b
1,0 m x 1,5 m	31,8 b	11,5 ab	99,3 ab
1,0 m x 2,0 m	84,8 a	12,2 a	123,2 a

-Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si

Segundo Minami et al. (1998), o aumento da densidade populacional resulta na competição entre plantas, sendo o desenvolvimento individual prejudicado. De acordo com Biasi e Deshamps (2009), os menores espaçamentos resultam em

menor aproveitamento dos recursos do meio, não expressando todo o potencial genético da planta.

Para o espaçamento o teor (%) do óleo essencial foi de 0,065 para 1,0 m x 0,5 m; de 0,078 para 1,0 m x 1,0 m; de 0,11 para 1,0 m x 1,5 m e 0,072 para 1,0 m x 2,0 m, não havendo diferença estatística significativa entre os tratamentos. A composição do óleo essencial de assa-peixe apresenta majoritariamente compostos sesquiterpenoides, exceto o β -pineno (Tabela 10). O composto β -Bourboneno apresentou maior porcentagem relativa no espaçamento 1,0 m x 2,0 m. O Humulemo epoxide II teve maior porcentagem relativa no espaçamento 1,0 m x 0,5 m.

Tabela 10 - Substâncias identificadas e suas proporções relativas (%) em amostras de óleo essencial de assa-peixe em diferentes densidades de plantio

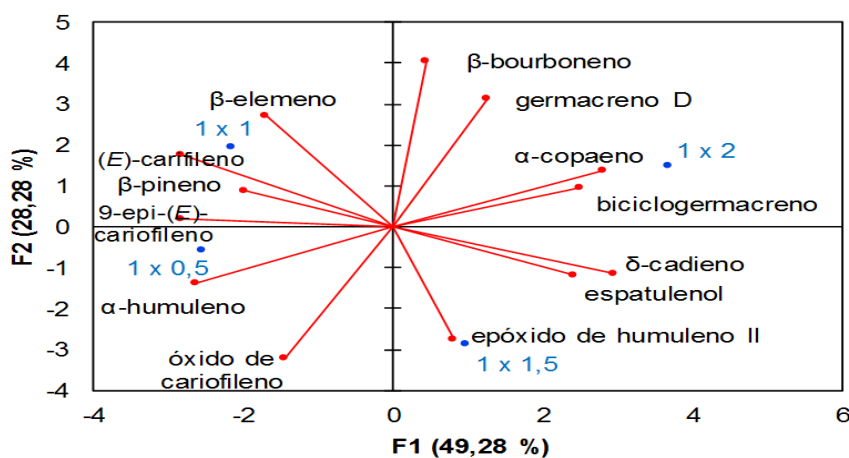
Substância	T1	T2	T3	T4	IRc	IRI
^{ns} β -Pineno	2,3325	2,734	2,414	2,184	977	974
^{ns} α -Copaeno	7,0325	6,95	7,34	8,526	1377	1374
** β -Bourboneno	1,76	1,646	1,62	1,938	1386	1387
^{ns} β -Elemeno	8,01	7,758	6,89	7,504	1393	1389
^{ns} β -Cariofileno	18,4475	18,482	16,81	16,614	1420	1417
^{ns} α -Humuleno	15,64	16,208	15,522	13,544	1454	1452
^{ns} β -epi-(E)-Cariofileno	2,6025	2,29	2,176	2,132	1461	1464
^{ns} Germacreno D	21,165	22,776	21,934	23,368	1481	1484
^{ns} Biciclogermacreno	7,27	8,896	9,496	10,098	1497	1500
^{ns} Epatulenol	2,0875	1,988	2,302	2,304	1578	1577
^{ns} δ -Cadieno	3,5525	3,876	4,56	4,438	1524	1522
^{ns} Oxido de cariofileno	4,2625	4,014	4,526	3,788	1582	1582
*Humulemo epoxide II	1,7675	1,512	1,672	1,556	1609	1608
Total de substâncias identificadas (%)	95,93	99,13	97,26	97,99		

* Significativo a 5% de probabilidade **Significativo a 1% de probabilidade NS Não significativo

T1- 1,0 x 0,5m; T2- 1,0 x 1,0 m; T3- 1,0 x 1,5 m; 1,0 x 2,0 m

Os dados para o óleo essencial de assa-peixe, presentes no gráfico 2 representada por dois eixos, apresentam 77,56% da variância total acumulada (Fator 1: 49,28% - CP 1; Fator 2: 28,28% - CP 2). Esse valor percentual indica a porcentagem do quanto está correto o agrupamento, pois quanto maior o fator melhor é a resolução e menor será a perda de informações de dados durante o agrupamento das amostras (NETO, 2010).

Gráfico 2 - Resultante do PCA para as análises cromatográficas do óleo essencial de assa-peixe para os espaçamentos



A influência de diferentes espaçamentos sobre a produção de biomassa foliar, que está intimamente ligada à produção de óleo essencial para diversos vegetais, varia com a espécie, a idade das plantas e a qualidade de sítio. Em espaçamentos fechados, se estabelece maior competição entre os indivíduos e antecipa a estagnação do crescimento volumétrico. Entretanto, algumas espécies arbóreas plantados em espaçamentos fechados, produzem inicialmente uma grande quantidade de biomassa foliar, exigindo normalmente um desbaste ou corte ainda na idade juvenil (BERNARDO, 1995; LADEIRA et al., 2001; LELES, 1995; PEREIRA, 1990; POGGIANI et al., 1984).

O espaçamento é um fator que influencia diretamente a biossíntese de compostos orgânicos. A produção de metabolitos secundários, controlada por fatores genéticos, é fortemente influenciada pelo ambiente. O cultivo acarreta, em alguns casos, efeito crítico sobre questões qualitativas e quantitativas de substâncias orgânicas. Esse efeito vai determinar tanto um aumento no crescimento do indivíduo, quanto no rendimento de tais compostos (BADI et al., 2004). Estudo na literatura avaliando a influência do espaçamento e produção de compostos secundários sugerem que o maior espaçamento resulta em maior rendimento de óleo essencial e mais elevada produção de biomassa (GOPICHAND et al., 2006), resultado que difere do observado aqui, onde o teor de óleo não diferiu para os tratamentos.

Para os compostos bioativos, apenas para os taninos observou-se diferença estatística sendo o espaçamento de 1,0 m x 2,0 m o que apresentou maior resultado, 997,3 mg EAG (Tabelas 11-12).

Tabela 11 - Resumo da análise de variância para atividade antioxidante (AA) %, conteúdo de taninos (mg EAG 100g⁻¹ de massa seca) e cumarinas (mg EqC 100g⁻¹ de massa seca) em diferentes espaçamentos

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios		
		AA	Taninos	Cumarinas
Espaçamento	3	1.302246 ^{ns}	139361.3684 ^{**}	89798.1179 ^{ns}
Erro	16	1.380226	9338.7548	108810.8135
Total	19			
CV(%)		1,30	12,73	42,5
Média geral		90,6	759,2	776,5

^{ns} Não Significativo ^{**}Significativo a 1% de probabilidade

Tabela 12 - Valores médios de taninos (mg EAG 100g⁻¹ de massa seca) em diferentes espaçamentos

Espaçamento entre plantas	Médias
	Taninos
1,0 m x 0,5 m	622,4 b
1,0 m x 1,0 m	669,3 b
1,0 m x 1,5 m	747,6 b
1,0 m x 2,0 m	997,3 a

-Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si

Taninos são considerados um dos materiais mais interessantes que podem ser obtidos das plantas (SHIRMOHAMMADLI et al., 2018). Estão ganhando crescente importância para diminuir o consumo de petróleo bruto e minimizar os impactos ambientais negativos (LUCKENEDER et al., 2016). Dentre as utilizações dos taninos, destaca-se a indústria de petróleo, fabricação de adesivos para madeira e derivados, tratamento de efluentes, além da importância no curtimento de peles, bastante empregado no Nordeste do Brasil. O assa-peixe é uma espécie que apresenta potencial de exploração para esse composto.

CONCLUSÃO

A melhor época de colheita para a *V. polyanthes*, para folhas, são aos 263 dias após o transplante, já que o rendimento de óleo essencial não apresenta diferença, o perfil químico do óleo essencial se mantém, e para os demais compostos não há diferença estatística, além de apresentar maior produção de biomassa seca. Por ser um período longo, permite apenas uma colheita ao ano. Para o espaçamento, o melhor foi de 1 m x 2 m para as características fitotécnicas e

levando-se em consideração também que o perfil e o rendimento do óleo não sofrem alteração, além de ser o espaçamento que obteve maior conteúdo de taninos solúveis.

REFERÊNCIAS

ALZUGARAY, D.; ALZUGARAY, C. **Flora brasileira: primeira enciclopédia de plantas do Brasil**. São Paulo: Três, 1984. v. 1. 66 p.

BARBASTEFANO, V.; COLA, M.; FERREIRA, A. L.; SILVA, E. F.; LIMA, C. A. H.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M. S. *Vernonia polyanthes* as a new source of antiulcer drugs. **Fitoterapia**, Milão, v. 78, p. 545–551, 2007.

BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; MATOS, M. O.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausana, v. 11, n. 2, p. 396-402, 2007.

BERNARDO, A. L. **Crescimento e eficiência nutricional de Eucalyptus spp. sob diferentes espaçamentos na região de cerrado de Minas Gerais**. 1995. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1995.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, 2000. ASPB. 1367 p.

CASTRO, N.E.A. **Época de plantio e método de colheita para maximização da produção de cálices de *Hibiscus sabdariffa* L.** 2003. 62 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras-UFLA. Lavras, MG. 2003.

CASTRO, P. R. et al. **Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática**. Piracicaba: Agronômica Ceres. 2005.

CAVALCANTI DE AMORIM et al. Standard Operating Procedures (SOP) for the Spectrophotometric Determination of Phenolic Compounds Contained in Plant Samples. 2012. **Lastet Research in Quality Control**. Intech, Isin Akyar. 2012.

CORRÊA JUNIOR C; MING LC; SCHEFFER MC. 1991. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. Curitiba: SEAB/ EMATER. 162p.1991.

GOMES, J. A. O. **Estudos complementares ao manejo do assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less.): fenologia, fitoquímica, histoquímica, anatomia e variação sazonal em população nativa**. 2017. 88 f. Tese (Doutorado Agronomia/Horticultura)- Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

GOPICHAND, R. D.; SINGH, R.L.; MEENA, M.K.; SINGH, V.K.; KAUL, B.L.; ACHARYA, R.; PRASAD, R. Effect of manure and plant spacing on crop growth,

yield and oil quality of curucuma aromática Salisb. In mind hill of western Himalaya. **Industrial Crops and Products**, v. 24, p. 105-112, 2006.

KÖPPEN, W. **Das geographische System der Klimate**. In: KÖPPEN, W.; GEIGER, R. (Eds): Handbuch der Klimatologie. Berlin: Gebrüder Bornträger, 1936. Banda 1, Parte C, p. 1-44.

LUCKENEDER, P; J. GAVINO, R. KUCHERNIG, A. PETUTSCHNIGG, G. TONDI Sustainable phenolic fractions as basis for furfuryl alcohol-based co-polymers and their use as wood adhesives. **Polymers**, v. 8, p. 396, 2016.

LIMA, H.R.P. ; KAPLAN, M.A.R. & CRUZ, A.V.M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Revista Floresta e Ambiente**, 10:71-77. 2003.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544 p.

MARTINS ER; CASTRO DM; CASTELLANI DC; DIAS JE. 1995. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV - Imprensa Universitária. 220p.

NETO, J. M. M. **Estatística Multivariada, Filosofia da Ciência**. Disponível em: <http://criticanarede.com/cien_estatistica.html 8/6/2008> Acesso em: 09 mai. 2004.

OLIVEIRA, D. G.; PRINCE, K. A.; HIGUCHI, C. T.; SANTOS, A. C. B.; LOPES, L. M. X.; SIMÕES, M. J. S.; LEITE, C. Q. F. Antimycobacterial activity of some Brazilian indigenous medicinal drinks. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 28, n. 2, 165-169. 2007.

PEREIRA, A. R. **Biomassa e ciclagem de nutrientes minerais em povoamentos jovens de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* em região de cerrado**. 1990. 167 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1990.

POGGIANI, F.; ZEN, S.; MENDES, F. S.; SPINA FRANÇA, F. Ciclagem e exportação de nutrientes em florestas para fins energéticos. **IPEF**, Piracicaba, v. 27, p. 17-30, 1984

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 102-123, 2001.

SILVEIRA, R. R.; FOGLIO, M. A.; GONTIJO, J. A. Effect of the crude extract of *Vernonia polyanthes* Less. on blood pressure and renal sodium excretion in unanesthetized rats. **Phytomedicine**, Jena, v. 10, n. 2, 127–131, 2003.

SILVEIRA, R. R.; RÚBIO, C. R.; ALVES, M. J. Q. F. Modificações da diurese e da pressão arterial em ratos Wistar anestesiados, após administração de infuso de assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 2, p. 31-35, 2000.

SHIRMOHAMMADLI, Y; EFHAMISISI, D; PIZZI, A. Tannins as a sustainable raw material for green chemistry: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 126, p. 316-332, 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2013.

TAVEIRA, F.S.N.; LIMA, W.N.; ANDRADE, E.H.A. & MAIA, J.G.S. Seasonal essential oil variation of Aniba canelilla. **Biochemical Systematics and Ecology**, 31:69-75. 2003.

VON HERTWIG, I.F. 1991. **Plantas aromáticas e medicinais: plantio, colheita, secagem, comercialização**. 2 ed. São Paulo: Ícone. 414p. 1991.

YADAVA, A.K. Cultivation of lemon grass (*Cymbopogon flexuosus*, 'CKP-25') under Poplar based agroforestry system. **Indian Forester**, 127:213-223. 2001.

LADEIRA, B. C.; REIS, G. G.; REIS, M. G. F.; BARROS, N. F. Produção de biomassa de eucalipto sob três espaçamentos, em uma seqüência de idade. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 25, n. 1, p. 69-78, 2001.

LELES, P. S. S. **Crescimento alocação de biomassa e distribuição de nutrientes e uso de água em *E. camaldulensis* e *E. pellita* sob diferentes espaçamentos**. 1995. 133 p. Dissertação (Mestrado em Solo e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1995.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O assa-peixe é uma espécie medicinal importante, que possui substâncias de interesse farmacológico na composição do óleo essencial. O perfil químico do óleo essencial não foi alterado independente do tratamento submetido. Por se tratar de uma espécie usada no tratamento de diversas afecções, somente o perfil do óleo não é suficiente, sendo necessária a determinação de outras classes de compostos. Responde ao aumento da saturação por base e é pouco exigente em adubação.

REFERÊNCIAS

- ALVES, H.M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v.3, p10-15. 2001.
- ALVES, V.; NEVES, L. Anatomia foliar de *Vernonia polyanthes* Less (Asteraceae). **Revista Universitária Rural**, Série Ciências da Vida;22(2):1-8. 2003.
- BIREME**. Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde. Biblioteca Virtual em Saúde. Descritores em Ciências da Saúde - DeCS. 2014 [Citado em: 2014 15/10/2014]; Disponível em: <http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decserver/>.
- BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. Brasília: ANVISA, 126p. 2011.
- BRASIL. **Ministério da Saúde**. Política nacional de medicina natural e práticas complementares-PMNPC. Brasília, DF, 2005.
- BRASIL. **Ministério da Saúde**. Portaria no. 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 04 mai. 2006.
- BARBASTEFANO, V. **Atividade antiulcerogênica de extratos brutos, frações semi-purificadas e substância ativa de duas espécies do gênero Vernonia: Vernonia polyanthes e Vernonia ferruginea**. Campinas, SP: Tese de Doutorado apresentada no Instituto de Biologia, Departamento de Fisiologia e Física, UNICAMP. 2007.
- BAYLÃO JUNIOR, H. F.; CARVALHO, D. C.; CONDE, M. M. S.; LORENZON, M. C.; MAIMON, Z. L.; GOMES, A. M. Plantas visitadas por Apoidea (Hymenoptera) na região de Cacaria, Município de Piraí-RJ. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 1110-1112, 2007. Suplemento 2.
- CARVALHO, C.C. O poder das palavras, às palavras do poder. **Revista Portuguesa de psicossomática**. Sociedade Portuguesa de Psicossomática v.6, n. 1. p. 55-62. 2004.
- CUNHA, A.P.; RIBEIRO, J.A.; ROQUE, O. R. **Plantas aromáticas em Portugal- Caracterizações e utilizações**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2007.
- DIAS, J.P.S. **A conquista do planeta azul**. O início do reconhecimento do oceano e do mundo (versão preliminar). Universidade do Algarve, e-book 47; 2004.
- HATTORI, E.K.O.; NAKAJIMA, J.N. **A família Asteraceae na Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental Galheiro**, Perdizes, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia*. 2008;59(4):687-749.
- HATTORI, E.K.O.; NAKAJIMA, J. **A família Asteraceae na Reserva Ecológica do Panga**, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. *Hoehnea*. 2011;38(2):165-214.

JORGE, L.I.F.; PEREIRA, U.; SILVA, A.M. Identificação histológica das principais compostas brasileiras de emprego medicinal. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. 1991;51(1/2):47-5

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas Infestantes e Nocivas**. 2ª ed. São Paulo: BASF; 1999.

LOPES, A. M. **Estudo da primeira centúria de Amato Lusitano. O uso das plantas, imagens de aromáticas da região da Serra da Estrela: abordagem da sua composição**. Disponível no www.historiadamedicina.ubi.pt/cadernos.html. 2004.

LOPES, C.R. et al. **Folhas de chá**. Viçosa: UFV, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.D.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2ª ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora; 2008.

MARTUCCI, M. E. P. **Análise da interação ecoquímica entre a lagarta-do-girassol *Chlosyne lacinia* (Lepidoptera: Nymphalidae) e as Asteraceae *Tithonia diversifoliae* *Vernonia polyanthes* utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas**. Ribeirão Preto, SP: Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, 2012.

MENDONÇA, C.B.F.; GONÇALVES-ESTEVEES, V.; ESTEVES, R.L.; NUNES, A.D. Palynotaxonomy of *Vernonanthura* H. Rob. (Vernonieae, Asteraceae) species from southeast Brazil. **Brazilian Journal of Botany**. 2009;32(4):647-62

MORAIS, L.; CARACAS, T.C.C.; DE PRINCE, P.M.A.; RAMOS, D.M.; ARAÚJO, G.L. Estruturas foliares de *Vernonia polyanthes* less. (asteraceae) relacionadas com a prospecção de substâncias com potencial medicinal. **Revista Bionorte**: 4:2, 31-39. 2015

PEREIRA, M. A. **Perfil cromatográfico das substâncias fenólicas presentes em extratos de mel de assa peixe e avaliação de seu poder antioxidante**. 2010. 67 f. Monografia (Licenciatura em Química)-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010. 67 p.

PERES, L.E.P. **Metabolismo secundário**. Piracicaba- São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/Universidade de São Paulo, 2004.p.1-10.

PROBST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. Botucatu, SP: Dissertação de Mestrado apresentada no Instituto de Biociências, UNESP, 2012.

SANTANA, P.; MARTÍNEZ, M.M.; PORTO, R.M.D.O.; LEÓN, T.O.; PAYROL, J.A.; GARCÍA, E.L.P. Estudio químico de los compuestos lipídicos de las hojas, tallos y flores de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. (Asteraceae). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. 2013;18(4):575-85.

SILVA, N. C.; BARBOSA, L.; SEITO, L. N.; FERNANDES, A. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. Taylor & Francis, **Natural Product Research**, Abingdon, v. 26, n. 16, p. 1510–1514, 2012.

TEIXEIRA-SANTOS, I. **Resíduos alimentares, infecções parasitárias e evidências do uso de plantas medicinais, em grupos pré-históricos das Américas**. Dissertação de mestrado pela Fundação Oswaldo Cruz, escola Nacional de Saúde Pública, rio de Janeiro; 2010.

WIESE, H. et al. **Nova Apicultura**. Porto Alegre. Livraria Agropecuária Ltda. 1983. 485 p.